



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Epidemiología Genética en Pacientes Españoles
con Hipoacusia de Herencia Autosómica
Dominante, Sindrómica y No Sindrómica,
utilizando Herramientas de Nueva Generación:
array-CGH y Secuenciación Masiva**

LUCÍA BORREGUERO ESCRIBANO

MADRID, 2016

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA



**Epidemiología Genética en Pacientes Españoles
con Hipoacusia de Herencia Autosómica
Dominante, Sindrómica y No Sindrómica,
utilizando Herramientas de Nueva Generación:
array-CGH y Secuenciación Masiva**

Memoria para optar al título de Doctor

presentada por Lucía Borreguero Escribano

Licenciada en Biotecnología

Directores de Tesis:

Dr. Miguel Ángel Moreno Pelayo

Dr. Matías Morín Rodríguez

Servicio de Genética

Hospital Ramón y Cajal

Madrid, 2016

Don Miguel Ángel Moreno Pelayo, Doctor en Ciencias Biológicas y Coordinador del Servicio de Genética del Hospital Ramón y Cajal, y Matías Morín Rodríguez Doctor en Ciencias Biológicas

CERTIFICAN:

Que Doña Lucía Borreguero Escribano ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: “Epidemiología Genética en Pacientes Españoles con Hipoacusia de Herencia Autosómica Dominante, Sindrómica y No Sindrómica, utilizando Herramientas de Nueva Generación: array-CGH y Secuenciación Masiva”

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 28 de Abril de 2016

Dr. Miguel Ángel Moreno Pelayo

Coordinador del Servicio de Genética

Hospital Ramón y Cajal, Madrid

Dr. Matías Morín Rodríguez

Investigador CIBERER

Hospital Ramón y Cajal, Madrid

VºBº Isabel Varela

Tutor académico Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid

AGRADECIMIENTOS

Es necesario el trabajo de muchas personas para presentar una tesis.

Quisiera agradecer en primer lugar a Felipe Moreno haberme permitido formar parte de su gran grupo de investigación. Muchas personas han pasado por su laboratorio, y estoy orgullosa de haber sido una de ellas. En segundo lugar debo agradecer a mis directores de tesis, Miguel Ángel Moreno y Matías Morín su apoyo, colaboración y paciencia para que todo este trabajo saliera adelante. A todas las personas que han pasado por el laboratorio 4 durante mis años de doctorado: Fernando, Ángeles, Emilia, Priscila y Luciana. Y a todos los integrantes del resto de los laboratorios que me han prestado su apoyo cuando lo he necesitado, y han hecho la vida como investigadora un poco más amena y divertida.

Pero algo como esto no comienza hace tan solo 6 años. Jamás me hubiera planteado un propósito como éste si no me hubieran inculcado el gusto por el estudio y el afán por conocer cómo funciona el mundo desde pequeña. Gracias a mis padres por hacer de mí una persona de provecho. Espero poder igualar vuestro trabajo en el futuro.

El apoyo anímico para terminar un trabajo como este lo he encontrado en mi familia, especialmente en David Bravo. No hay mejor terapia que correr a tu lado para renovar energías. Y la alegría de volver a casa y tener una familia que me recibe con una sonrisa independientemente del día que hayan tenido no tiene precio. Por eso este trabajo se lo quiero dedicar a Eva y a Alicia. Ellas me han enseñado que el final siempre llega, queramos o no, y lo mejor es disfrutar del camino acompañado.

RESUMEN

La hipoacusia representa el déficit neurosensorial más frecuente y se caracteriza por una alta heterogeneidad clínica y genética. En este trabajo analizamos la eficacia de la secuenciación masiva y de los arrays CGH para el estudio de esta patología. Hemos sido capaces de diagnosticar el 44% de los pacientes con hipoacusia neurosensorial de herencia autosómica dominante utilizando el OTO-NGS-panel. Los resultados obtenidos con esta herramienta en población española demuestran que *TECTA* y *MYO6* tienen la mayor prevalencia, con un 11 % y 8% respectivamente, seguidos de *POU4F3* con un 5%. Además, hemos hecho un análisis epidemiológico de pacientes con hipoacusia sindrómica. Se han analizado 50 casos de pacientes con el Síndrome de BOR, y se ha encontrado la mutación causante de la enfermedad en el 40% de ellos, todos con mutaciones puntuales o deleciones en el gen *EYAI*. El uso del OTO-CGH-array en los pacientes con deleciones completas del gen *EYAI* ha demostrado que en estos casos la delección no afecta tan solo a este gen, sino también a otros 7 genes contiguos. También se han estudiado 14 familias españolas con individuos afectados por el Síndrome de Stickler. Hemos aclarado el 50% de ellas: 6 casos familiares poseen mutaciones en el gen *COL2A1*, y la última familia diagnosticada representa el primer caso de Síndrome de Stickler de herencia recesiva en población española con una mutación en homocigosis en el gen *COL9A1*.

SUMMARY

Hearing loss represents the most common sensory deficit in human, characterized by high clinical and genetic heterogeneity. In the present work, we analyze the efficiency of using Next Generation Sequencing and Comparative Genomic Hybridization arrays (aCGH) to diagnose patients of this pathology. We have genetically diagnosed 44% of Autosomal Dominant NonSyndromic Hearing Loss (ADNSHL) patients using OTO-NGS-panel. Results obtained with Spanish ADNSHL patients demonstrate that *TECTA* and *MYO6* are the most prevalent genes causative of deafness, with a 11% and 8% of representation each, followed by *POU4F3* with a 5% of prevalence. Moreover, we have done an epidemiological study of syndromic hearing loss patients. We have analysed 50 BOR Syndrome patients, and have found the causative mutation in 40%, all of them with point mutations or deletions in *EYAI* gene. The use of OTO-CGH-array in patients with whole *EYAI* gene deletions have shown that this deletion affects not only *EYAI* gene but also 7 contiguous genes. We have also studied 14 Spanish Stickler Syndrome patients, and have resolved 50% of them: 6 cases have *COL2A1* point mutations, and the last one represents the first case of Spanish recessive Stickler Syndrome patients with a point mutation in homocigosis in *COL9A1*.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1 Anatomía y funcionamiento del oído en mamíferos..... | 19 |
| 1.1 Anatomía general del oído..... | 19 |
| 1.2 Anatomía de la cóclea adulta..... | 19 |
| 1.3 Fisiología de la audición..... | 22 |
| 2 La sordera: aspectos generales..... | 23 |
| 2.1 Epidemiología..... | 23 |
| 2.2 Clasificación..... | 24 |
| 3 Genética de las Hipoacusias Hereditarias No Sindrómicas..... | 26 |
| 4 Hipoacusia hereditaria sindrómica..... | 27 |
| 4.1 Síndrome de Stickler..... | 27 |
| 4.2 Síndrome Branquio-Oto-Renal (BOR) | 28 |
| 5 Nuevas tecnologías en el campo de la sordera..... | 29 |
| 5.1 Array de Hibridación Comparativa del Genoma: array CGH..... | 29 |
| 5.1.1 Tecnología del array CGH..... | 29 |
| 5.1.2 Aplicación del array CGH al campo de la sordera | 31 |
| 5.2 Secuenciación masiva: Next Generation Sequencing (NGS) | 32 |
| 5.2.1 Tecnología de la NGS | 32 |
| 5.2.2 Captura de secuencia | 36 |
| 5.2.2.1 Tecnología Haloplex | 36 |
| 5.2.3 Aplicación de la secuenciación masiva al campo de la sordera | 38 |
| OBJETIVOS | 39 |
| MATERIALES Y METODOS | 43 |
| 1 Selección de pacientes | 45 |
| 2 Herramientas de Nueva Generación | 45 |
| 2.1 Microarrays | 45 |
| 2.1.1 Array de Hibridación Comparativa del Genoma (aCGH) | 45 |
| 2.2 Secuenciación Masiva (NGS) | 46 |
| 2.2.1 Sistema de captura líquida utilizando la tecnología Nimblegen | 46 |
| 2.2.2 Sistema de enriquecimiento de secuencia utilizando la tecnología Haloplex | 46 |
| 2.2.3 Análisis y tratamiento de los resultados obtenidos por secuenciación masiva..... | 47 |
| 2.2.4 Secuenciación del exoma completo de 3 individuos afectados de la familia DFNA49 | 47 |
| 3 Estudios genético-moleculares de validación | 47 |
| 3.1 Amplificación por PCR | 47 |

| | |
|--|------------|
| 3.2 Secuenciación Sanger | 48 |
| 3.3 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) | 48 |
| 3.4 Análisis de ligamiento mediante uso de microsatélites | 49 |
| 3.5 Transformación bacteriana..... | 49 |
| 3.6 RT-PCR..... | 49 |
| RESULTADOS..... | 51 |
| A) Hipoacusia no sindrómica | 53 |
| 1 Diseño de un array CGH dirigido a genes causantes de sordera: OTO-CGH-array..... | 53 |
| 1.1 Diseño del array CGH utilizando diferentes plataformas | 53 |
| 1.2 Validación de los diseños aCGH: OTO-CGH-array | 63 |
| 1.3 Análisis de pacientes de hipoacusia autosómica dominante con OTO-CGH-array (Tecnología Agilent) | 65 |
| 2 Diseño de sistemas de captura dirigida a genes implicados en sordera: OTO-NGS-Panel..... | 66 |
| 2.1 Tecnología Nimblegen | 66 |
| 2.1.1 Diseño: Captura de regiones génicas | 66 |
| 2.1.2 Validación del diseño utilizando la plataforma de secuenciación SOLiD (Life Technologies)..... | 68 |
| 2.2 Tecnología Agilent: Haloplex | 71 |
| 2.2.1 Diseño: Captura de regiones exónicas: OTO-NGS-Panel | 71 |
| 2.2.2 Validación utilizando la plataforma de secuenciación MiSeq(Illumina)..... | 71 |
| 2.3 Comparación de los resultados obtenidos por ambas tecnologías..... | 75 |
| 3 Transferencia a mercado de los diseños validados: OTO-NGS-Panel y OTO-CGH- array..... | 77 |
| 4 Estudio genético de 110 pacientes con hipoacusia AD mediante OTO-NGS-Panel..... | 77 |
| 5 Estudio del gen asociado a la hipoacusia subtipo DFNA49 mediante aCGH y NGS.... | 93 |
| B) Hipoacusia sindrómica..... | 96 |
| 6 Estudio genético de 14 familias españolas con Síndrome de Stickler..... | 96 |
| 7 Estudio genético de 50 pacientes propósito españoles con Síndrome de BOR..... | 104 |
| DISCUSIÓN..... | 111 |
| CONCLUSIONES..... | 125 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 129 |
| MATERIAL SUPLEMENTARIO..... | 163 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| aCGH | Array de hibridación genómica comparada (array-Comparative Genomic Hybridization) |
| AD | Autosómica Dominante |
| ADN | Ácido Desoxiribonucleico |
| BOR | Síndrome Branquio-Oto Renal |
| CCEs | Células Ciliadas Externas |
| CCIs | Células Ciliadas Internas |
| CNVs | Variaciones en el Número de Copias (Copy Number Variation) |
| CSs | Células de Soporte |
| dB | Decibelio |
| dNTP | Deoxinucleótido trifosfato |
| Del | Deleción |
| DFN | <i>Locus</i> de hipoacusia no síndrómica ligados al cromosoma X (<i>DeaFNess</i>) |
| DFNA | <i>Locus</i> de hipoacusia no síndrómica de herencia autosómica dominante |
| DFNB | <i>Locus</i> de hipoacusia no síndrómica de herencia autosómica recesiva |
| dNTP | desoxinucleótido trifosfato |
| EV | Estría Vascular |
| HNSHAD | Hipoacusia No Síndrómica de Herencia Autosómica Dominante |
| Hz | Herzio |
| Kb | Kilobase |
| MAF | Alelo de Frecuencia Mínima (Minor Allele Frequency) |
| MB | Membrana Basilar |
| MLPA | Amplificación Múltiple de Sondas dependientes de Ligación (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) |
| MR | Membrana de Reissner |

| | |
|-----|--|
| MT | Membrana Tectoria |
| NGS | Secuenciación de Nueva Generación, Secuenciación masiva (Next Generation Sequencing) |
| NSs | Neuronas Sensitivas |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction) |
| PPi | Pirofosfato |
| SNP | Polimorfismo de una sola base (Single Nucleotide Polimorfism) |
| STL | Síndrome de Stickler |

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía y funcionamiento del oído en mamíferos

1.1. Anatomía general del oído

El sentido de la audición reside en el oído, órgano sensorial que en humanos se sitúa a ambos lados de la cabeza, en la región temporal. El oído se puede dividir en tres partes (Fig. 1A):

- El **oído externo**, está formado por el pabellón auricular u oreja y el canal auditivo externo que está limitado en su parte interna por el tímpano.

- El **oído medio**, que comprende el tímpano o membrana timpánica, la cavidad timpánica (situada dentro del hueso temporal y comunicada con la nasofaringe a través de la trompa de Eustaquio), y la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo).

- El **oído interno** o laberinto, está alojado en el hueso temporal y lo forman dos sistemas sensoriales distintos: el vestíbulo (comprendido por el sáculo, el utrículo y tres canales semicirculares) responsable del equilibrio, y la cóclea, responsable de la audición (Ekdale EG. 2015). Su función es la de transformar los estímulos mecánicos (sonoros y de aceleración) en impulsos nerviosos, que se transmiten al sistema nervioso central a través de las fibras del octavo par craneal o nervio auditivo (Appler JM. 2011). Tanto el vestíbulo como la cóclea están formados por una serie de cavidades y conductos interconectados y rellenos de endolinfa que constituyen el laberinto membranoso. Éste, a su vez, se halla sumergido en la perilinfa del laberinto óseo, que se comunica con el oído medio a través de dos orificios: la ventana oval, en la cual se inserta la base del estribo, y la ventana redonda, recubierta de una membrana. (Khan S. 2013) (Fig. 1B y C).

1.2. Anatomía de la cóclea adulta

La cóclea humana es un conducto membranoso de unos 3-3.5 cm. de longitud que se enrolla sobre sí mismo describiendo dos vueltas y media en torno a un eje central llamado modiolos, por donde viaja el nervio coclear que forma parte del octavo par craneal (Yang T. 2011). Externamente, la cóclea está protegida por una envoltura ósea denominada cápsula ótica. En el interior, el conducto, lleno de fluido, se divide en tres rampas: rampa vestibular, rampa coclear o media y rampa timpánica (Fig. 1C).

Las rampas vestibular y timpánica se unen en la parte apical de la cóclea, el helicotrema y se comunican con el oído medio a través de dos discontinuidades en la envoltura ósea: la ventana oval que conecta el oído medio con la rampa vestibular y en ella se apoya la platina del estribo, y la ventana redonda que comunica el oído medio con la rampa timpánica. La rampa coclear está delimitada por la membrana de Reissner (MR) que la separa de la rampa vestibular y por la membrana basilar (MB), que es el límite anatómico con la rampa timpánica (Fig1C).

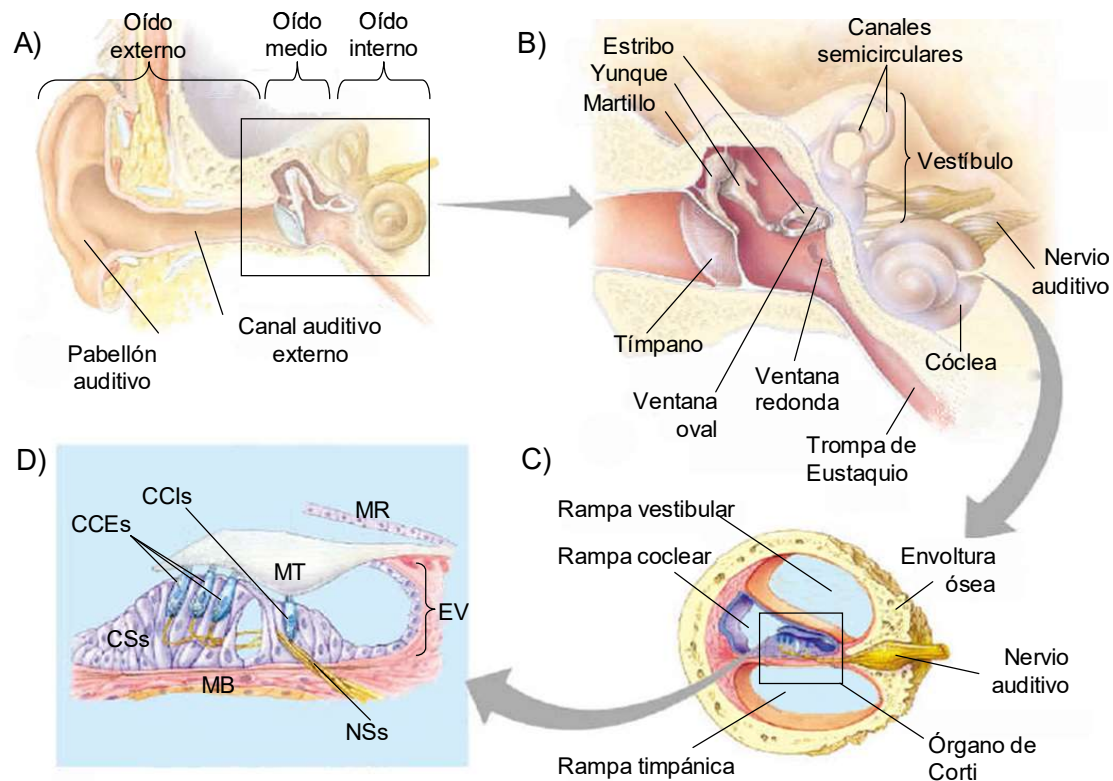


Figura 1. Anatomía del oído. A) Representación gráfica del oído en la que se marcan sus diferentes regiones. B) Detalle del oído medio e interno en el que se destacan las estructuras básicas que los componen. C) Representación gráfica de una sección de la cóclea en la que aparecen señaladas las partes que forman el laberinto. D) Componentes básicos del órgano de Corti, órgano de la audición propiamente dicho. CSs: células de soporte; CCEs: células ciliadas externas; CCIs: células ciliadas internas; MB: membrana basilar; MT: membrana tectoria; NSs: neuronas sensitivas; MR: membrana de Reissner; EV: estría vascular.

La composición iónica del fluido que ocupa las rampas vestibular y timpánica, la perilinfa, es similar a la del líquido cerebroespinal del que deriva. Sin embargo, al contrario que en la perilinfa, el fluido que ocupa la rampa media, denominado endolinfa,

posee una mayor concentración de cationes potasio (K^+) que de cationes sodio (Na^+). Esta diferencia en la concentración iónica genera una diferencia de potencial entre ambos fluidos de alrededor de +80mV que se denomina potencial endococlear (Wangemann P. 2006). El órgano de la audición propiamente dicho, el órgano de Corti (Fig. 1D), se encuentra en la rampa coclear y se apoya sobre la membrana basilar. En el órgano de Corti existen dos tipos de células, las células de soporte, clasificadas según su localización y su función concreta, y las células sensoriales que reciben el nombre de células ciliadas (CCs) y se disponen formando hileras longitudinales, a lo largo de la cóclea. Se diferencian dos tipos: las células ciliadas internas (CCIs) dispuestas en una única hilera, y las células ciliadas externas (CCEs) que forman tres hileras (Kelley MW. 2006). Las células sensoriales, y por tanto, transmisoras de la información auditiva son las CCIs; las CCEs, se caracterizan principalmente por presentar capacidad motil, aunque también poseen rasgos sensoriales, y son responsables de la amplificación de la respuesta de la cóclea al estímulo sonoro y de la sintonización fina de las frecuencias (Ospeck M. 2006, Goutman JD. 2015). Ambos tipos de CCs se caracterizan por poseer en su parte apical un penacho de *microvilli* rígidos llamados estereocilios que poseen en su interior un haz de filamentos de actina ordenados en paralelo que aporta rigidez a su estructura. La disposición de los estereocilios es característica del tipo de célula. En las CCIs los estereocilios están dispuestos formando un penacho lineal, mientras que en las CCEs se disponen en un penacho en forma de “V” o “W”. Ambos penachos están formados por tres hileras de estereocilios cuya longitud aumenta progresivamente desde la hilera interna a la más externa, situada hacia la parte lateral de la cóclea, adoptando una conformación en escalera. Cada estereocilio establece uniones con los estereocilios adyacentes por la parte basal, lateral o apical. Estas últimas uniones denominadas *tip links*, se establecen entre los estereocilios de hileras consecutivas (Sakaguchi A. 2009). La región apical de los estereocilios que componen la hilera más externa de las CCEs, se inserta en la membrana tectoria, que es una estructura gelatinosa compuesta por matriz extracelular que se tiende sobre el órgano de Corti (Fig. 1D) (Gavara N. 2011). El órgano de Corti se apoya sobre la membrana basilar que tiene la capacidad de vibrar en respuesta al estímulo sonoro. La parte interna de dicha membrana se ancla a la lámina espiral ósea mientras que su parte externa se prolonga en el ligamento espiral lo que confiere elasticidad a su movimiento. Las raíces del ligamento espiral se introducen en otra importante estructura denominada estría vascular, que está implicada en el mantenimiento del potencial endococlear y el enriquecimiento en K^+ de la endolinfa

(Guinan JJ. 2012). Todas las células que conforman el órgano de Corti están unidas en su parte apical por uniones estrechas (*tight junctions*) que permiten el aislamiento del interior de la ramba media necesario para el mantenimiento del potencial endococlear.

1.3. Fisiología de la audición

La audición del sonido comienza con la captación de las ondas sonoras por el pabellón auditivo y la conducción de las mismas a través del canal auditivo externo hasta el tímpano. En el oído medio, la vibración del tímpano se transmite por la cadena de huesecillos hasta alcanzar la ventana oval. Por acción de la platina del estribo sobre la ventana oval, el sonido se transforma en una onda de presión que recorre la perilinfa de la ramba vestibular. La cóclea presenta una organización tonotópica, de forma que la sensibilidad a las distintas frecuencias varía gradualmente de la base (donde se procesan las frecuencias altas) al ápex (responsable del procesamiento de las frecuencias bajas). Por tanto, la onda de presión generada hace vibrar por resonancia a la membrana basilar en un punto concreto dependiendo de la frecuencia del sonido recibido. El proceso por el cual las fuerzas mecánicas de las ondas auditivas se transforman en impulsos nerviosos, se denomina mecanotransducción (Hudspeth AJ.1989). El movimiento de la membrana basilar provoca el desplazamiento lateral de los estereocilios de mayor longitud de las CCEs que están insertados en la superficie de la membrana tectoria y se transmite a todos los estereocilios del penacho gracias a las uniones apicales (*tip links*) que los conectan. El movimiento de los estereocilios abre canales iónicos dependientes de tensión mecánica asociados a las uniones apicales, a través de los cuales pasan iones K^+ a favor de gradiente electroquímico. La entrada de iones con carga positiva, despolariza la célula, lo que activa el movimiento contráctil de las CCEs que amplifica la oscilación de la membrana basilar (fenómeno conocido como “amplificación” coclear). Como resultado, se produce la excitación de las CCIs. Las CCIs también se despolarizan por la entrada pasiva de iones K^+ en su interior a través de canales asociados a mecanorreceptores (se desconoce si el mecanorreceptor y el canal son la misma entidad molecular) que se activan como consecuencia del movimiento de los estereocilios. La despolarización desencadena la entrada de calcio a través canales específicos sensibles a voltaje, lo que provoca la fusión con la membrana plasmática de vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisores (glutamato) al espacio sináptico. Allí, las células nerviosas que forman las fibras aferentes son excitadas y conducen los impulsos eléctricos hacia el sistema nervioso central.

Una vez que se ha transmitido la información, las células deben repolarizarse lo más rápidamente posible para quedar preparadas para la recepción de nuevos estímulos. Dos factores contribuyen a la repolarización: el mecanismo de “adaptación” que existe en los estereocilios, que permite que los canales de mecanotransducción se cierren antes de que los estereocilios vuelvan a su posición inicial mediante la relajación de las uniones apicales (dependiente de calcio), y la apertura de canales dependientes de voltaje localizados en la membrana basolateral, que permite una fuga de K^+ hacia el espacio extracelular bañado por perilinfa de donde es captado por las células de soporte que lo conducen a través de un sistema de uniones comunicantes (*gap junctions*) hacia la región de la estría vascular desde donde es vertido de nuevo a la endolinfa (Kennedy HJ. 2012).

El oído, y la cóclea en concreto, es un sistema muy complejo desde el punto de vista estructural y funcional. En humanos, las células sensoriales del órgano de Corti no tienen capacidad de regeneración por lo que cualquier alteración o agresión sobre ellas se traduce en una pérdida de función que se va a manifestar como una disminución de la capacidad auditiva (Atkinson PJ. 2015).

2. La sordera: Aspectos generales

2.1. Epidemiología

La sordera o hipoacusia es el trastorno sensorial más frecuente en humanos. En los países desarrollados, alrededor de un 6-8% de la población presenta déficit auditivo en algún grado que afecta a la comunicación normal. En países desarrollados, aproximadamente 1 de cada 1000 niños padece sordera grave o profunda en el nacimiento o primera infancia (periodo prelocutivo, previo a la adquisición del lenguaje). De estos casos, se ha estimado que alrededor del 60% tendría un origen genético (datos referentes a países desarrollados) (Morton NE. 1991; Marazita ML. 1993). Con la edad, el porcentaje de individuos con hipoacusia aumenta de forma significativa; se calcula que alrededor de un 5% de la población por debajo de los 45 años y un 50% de las personas de más de 80 años padecen un trastorno de la audición que merma su capacidad de comunicación (Petersen Mb. 2002). Las sorderas postlocutivas, en general, son consideradas como el resultado de la combinación entre factores genéticos y ambientales. Cabe destacar de entre ellas, la otoesclerosis y la

presbiacusia (pérdida auditiva relacionada con la edad) en las que el componente genético domina sobre el ambiental (Kalatzis V. 1998; Petersen Mb. 2002).

La pérdida auditiva de cualquier grado y a cualquier edad en la que aparezca afecta negativamente a la comunicación del individuo con su entorno. La sordera prelocutiva da lugar a problemas en la adquisición del lenguaje y por tanto afecta negativamente al desarrollo social e intelectual del sujeto que la padece. La sordera postlocutiva, en cambio, puede empeorar con el tiempo y contribuye al progresivo aislamiento del individuo. En cualquier caso la detección precoz de la hipoacusia puede ayudar al menos, a atenuar sus efectos negativos en la integración del individuo en la sociedad.

2.2. Clasificación

Las hipoacusias pueden clasificarse en base a sus características clínicas y genéticas. Clínicamente, las sorderas se definen en función de los siguientes criterios (Willems PJ. 2000; Tekin M. 2001; Smith RJH. 2009):

- Asociación: la hipoacusia puede aparecer acompañada de anomalías en el oído externo u otros órganos (por ejemplo, retinitis pigmentosa, bocio, nefritis, problemas dermatológicos, etc) y entonces se habla de **hipoacusia sindrómica**; o puede aparecer como único signo clínico, causada por anomalías del oído interno o medio, en cuyo caso se habla de **hipoacusia no sindrómica**.
- Localización del defecto: cuando el defecto está en el oído externo o medio, la sordera es denominada **conductiva**; si hay lesión en el oído interno, **neurosensorial**; si hay una combinación de las dos anteriores, **mixta**, y cuando el origen de la hipoacusia está en las vías auditivas superiores, se habla de una hipoacusia **central**.
- Edad de aparición: la hipoacusia es **prelocutiva** cuando se manifiesta antes de la adquisición del lenguaje. Dentro de este grupo, las congénitas son aquellas que están presentes en recién nacidos. La hipoacusia es **postlocutiva** cuando se presenta una vez adquirido el lenguaje.
- Frecuencias afectadas: pueden estar afectadas las frecuencias **bajas** (por debajo de 500 hercios (Hz)), las frecuencias **medias** (entre 501-2000 Hz) y las frecuencias **altas** (por encima de 2000 Hz).

- Gravedad: hace referencia al grado de pérdida auditiva, cuantificado como la media para las frecuencias de 0.5, 1, 2 y 4 kHz en el oído con mejor audición. Atendiendo a este valor, la sordera puede ser **leve**, cuando la pérdida es de entre 20 y 40 decibelios (dB); **moderada**, cuando la pérdida está entre 41 y 70 dB; **grave**, si la pérdida es de entre 71 y 95 dB, y **profunda** cuando supera los 95 dB.
- Progresión: la sordera puede ser **estable**, si no varía en grado con el tiempo; **progresiva**, si el deterioro de la audición es superior a 15 dB (como media para las frecuencias 0.5, 1, 2 kHz) en un periodo de 10 años, o **fluctuante**, cuando el grado de afectación del individuo varía a lo largo del tiempo con periodos de mejoría seguidos de otros de empeoramiento.
- Simetría: la sordera puede ser **unilateral** si afecta sólo a uno de los oídos o **bilateral** si afecta a los dos oídos.
- Alteraciones vestibulares: se presentan como mareos, vértigo, pérdidas de equilibrio, etc, y pueden ir o no acompañando a la sordera.
- Acúfenos: son sonidos que el individuo puede escuchar en ausencia de estimulación y de forma independiente a ésta. Pueden presentarse en algunos casos junto con la pérdida auditiva.

Genéticamente, las sorderas hereditarias son muy heterogéneas, aunque en su mayoría están causadas por la alteración de un único gen (monogénicas). Las sorderas no sindrómicas se pueden clasificar según su patrón de herencia en autosómicas recesivas (70-80% del total de sorderas hereditarias), autosómicas dominantes (10-20%), ligadas al cromosoma X (1-2%), ligadas al cromosoma Y (un único caso descrito, Wang QJ. 2004) y de herencia materna o mitocondrial (0-2% según poblaciones) (Tekin M. 2001; Morton CC. 2002). La sordera no sindrómica autosómica recesiva es, en general, prelocutiva, casi siempre congénita, neurosensorial, grave o profunda, estable y con afectación de todas las frecuencias. En cambio, la sordera no sindrómica autosómica dominante suele ser postlocutiva, neurosensorial, menos grave en su comienzo pero progresiva en el tiempo y en algunos casos con alteración de un intervalo concreto de frecuencias (Petit C. 1996; Bom SJ. 1999). Este trabajo se centra en las sorderas sindrómicas y no sindrómicas de herencia autosómica dominante.

3. Genética de las Hipoacusias Hereditarias No Sindrómicas

La localización e identificación de genes de sordera comenzó en la década de los 90 (León PE. 1992). La estrategia clásica de trabajo en el estudio genético de las sorderas no sindrómicas ha sido el análisis de ligamiento en casos familiares de hipoacusia (Vahava O. 1998; Modamio-Hoybjor S. 2007). Para que la información resultante del análisis sea concluyente la familia debe estar compuesta por un número alto de individuos que padezcan el mismo tipo de sordera, distribuidos en varias generaciones. De esta forma se identificaron los primeros *loci* y genes de sordera no sindrómica. A medida que fueron identificándose más localizaciones, los *loci* se clasificaron y se nombraron de la siguiente forma: a los *loci* con herencia autosómica dominante le corresponden las siglas DFNA, a los de herencia autosómica recesiva, DFNB, a los de herencia ligada al cromosoma X, DFN y a los ligados al cromosoma Y, DFNY. A los acrónimos se les añade un índice numérico que hace referencia al orden en que se han ido identificando (Smith RJH. 2014). En la actualidad, se han mapeado 52 *loci* DFNA, 80 *loci* DFNB, 5 DFN y 1 DFNY (Van Camp G. 2014). De todos los *loci* mapeados, se ha identificado el gen responsable en 94 casos (54 genes DFNB, 27 DFNA, 9 genes que pueden ser DFNA o DFNB y 4 DFN). Estos genes codifican proteínas con variedad de funciones, unas conocidas y otras aún por determinar (Petit C. 2001; Friedman TB. 2003; Finsterer J. 2005; Van Camp G. 2014, Egilmez OK. 2016). En algunos casos, las diferentes mutaciones en un gen determinado pueden estar asociadas a sorderas con manifestaciones clínicas y patrones hereditarios distintos (por ejemplo *GJB2*, *GJB6* o *TECTA*) e incluso a sorderas sindrómicas (por ejemplo *COL11A2* que está asociado a sordera tipo DFNA13 y al síndrome de Stickler, o el gen *MYO7A* que está asociado a sordera dominante tipo DFNA11, a sordera recesiva tipo DFNB2 y al síndrome de Usher tipo 1B, de herencia recesiva). Además, puede haber varios genes asociados a sordera localizados en un mismo *locus*. Ejemplos de esto son, el *locus* DFNA3/B1 que contiene dos genes, *GJB6* (Conexina 30) y *GJB2* (Conexina 26), y el *locus* DFNA2 en el que se encuentran los genes *KCNQ4* y *GJB3* (Conexina 31) y en el que se piensa que aún podría haber un tercer gen (Dominguez LM. 2012, Goldstein JA. 2002).

En los últimos años, la investigación en el campo de la genética de las sorderas ha experimentado un gran desarrollo gracias a la disponibilidad de la secuencia del genoma humano y a la identificación de genes que se expresan específicamente (EST:

Expressed Sequence Tag) en la cóclea, humana y en la de otros organismos como el ratón. Esta especie animal se utiliza como modelo de estudio para las sorderas en humano debido a la gran similitud que guardan las cócleas de ambas especies tanto a nivel anatómico como funcional (Friedman LM. 2007). La localización de genes relacionados con la audición en ratón ha sido más fructífera que en humano y, hasta el momento, se han identificado más de 200 genes relacionados con la audición (Probst FJ. 1999; Kikkawa Y. 2012). Sólo en algunos casos se ha encontrado y validado el gen ortólogo en humanos. Estos datos, ponen de manifiesto la enorme heterogeneidad genética de este déficit neurosensorial así como la complejidad del proceso auditivo. De hecho, se postula que el 1% de los genes humanos, lo que supone entre 300 y 500 genes, están implicados en el buen funcionamiento del proceso auditivo (Friedman TB. 2003; Finsterer J. 2005).

4. Hipoacusia hereditaria sindrómica

En la actualidad se han descrito más de 400 tipos de hipoacusia sindrómica (Yalan L. 2014). En este estudio vamos a centrarnos en el estudio de dos de los más frecuentes: Síndrome de Stickler y Síndrome de BOR.

4.1. Síndrome de Stickler

El síndrome de Stickler es una enfermedad del tejido conjuntivo que afecta a 1 de cada 7500 a 9000 recién nacidos (Robin NH. 1993). Los síntomas que caracterizan este síndrome incluyen problemas oftalmológicos, auditivos, articulares y dismorfismos faciales (Stickler GB. 1965). Esta enfermedad tiene una expresividad variable y penetrancia incompleta, lo que se observa en la elevada variabilidad fenotípica intra- e inter-familiar. Entre los problemas oftalmológicos más frecuentes se encuentra la miopía grave y progresiva, y la degeneración vitreo-retiniana que puede degenerar en cataratas y/o desprendimiento de retina a edades muy tempranas. Los problemas auditivos pueden deberse a sordera conductiva, neurosensorial o mixta. Las articulaciones pueden presentar una degeneración prematura con desarrollo anormal de la epífisis e hipermovilidad articular. La hipoplasia malar, el puente nasal ancho, la micrognatia o el paladar hendido se encuentran entre los rasgos dismórficos faciales más comunes.

El síndrome de Stickler fue inicialmente descrito como un síndrome de herencia autosómica dominante, y clasificado en 3 tipos dependiendo de las manifestaciones

clínicas de los pacientes y su diagnóstico genético (Rose PS. 2005). El síndrome de Stickler tipo 1 (STL1) se caracteriza por alteraciones del humor vítreo de tipo membranoso y representa el tipo de Stickler más frecuente, afectando al 60% de los pacientes de Stickler (Acke FR. 2012). Estos pacientes presentan mutaciones en el gen *COL2A1* (OMIM 108300). El síndrome de Stickler tipo 2 (STL2) se caracteriza por un humor vítreo con filamentos irregulares y engrosados con apariencia de esfera, y es causado por mutaciones en el gen *COL11A1* (OMIM 604841). El síndrome de Stickler tipo 3 (STL3) se caracteriza por la ausencia de manifestaciones oculares y es causado por mutaciones en el gen *COL11A2* (OMIM 184840).

El primer caso de síndrome de Stickler de herencia autosómica recesiva (STL4) fue descrito en una familia marroquí en la cual los afectados presentaban una mutación patogénica en homocigosis en el gen *COL9A1* (OMIM 120210) (Van Camp G. 2006). Posteriormente se ha descrito un nuevo caso de pacientes de Stickler tipo 4 (Nikopoulos K. 2011), y mutaciones en los genes *COL9A2* (OMIM 120260) (Baker S. 2011) y *COL9A3* (OMIM 120270) (Faletra F. 2013), los cuales han sido designados como causantes del síndrome de Stickler tipo 5 (STL5) y 6 (STL6) respectivamente.

Todos los genes conocidos hasta ahora como causantes del síndrome de Stickler codifican proteínas colágeno, las cuales se asocian entre sí a través de su dominio Gxy para formar macromoléculas con conformación triple hélice en la matriz extracelular. Los genes *COL2A1*, *COL11A1* y *COL11A2* codifican cadenas de colágenos $\alpha 1(\text{II})$, $\alpha 1(\text{XI})$ y $\alpha 2(\text{XI})$ respectivamente (Myllyharju J. 2001, Eyre DR. 2002, Reginato AM. 2002, Carter EM. 2009). Las cadenas de colágeno II forman homotrímeros de cadenas $\alpha 1(\text{II})$, mientras que los colágenos XI forman heterotrímeros de cadenas de colágeno $\alpha 1(\text{II})$, $\alpha 1(\text{XI})$ y $\alpha 2(\text{XI})$. Todos ellos forman fibrillas que dan fuerza estructural al humor vítreo del ojo y al cartílago. Los genes *COL9A1*, *COL9A2* y *COL9A3* codifican cadenas de colágeno tipo IX que forman heterotrímeros que se asocian al colágeno de las fibrillas ya existentes (Myllyharju J. 2001).

4.2. Síndrome Branquio-Oto-Renal (BOR)

El síndrome Branquio-Oto-Renal (BOR) (MIM113650) es una enfermedad de herencia autosómica dominante, con una incidencia de 1 cada 40.000 nacidos, y que afecta al 2% de niños con sordera profunda (Fraser FC, 1980). Las manifestaciones clínicas del síndrome de BOR son muy variables, pero entre los síntomas que lo

caracterizan se encuentra la sordera, problemas renales, y anomalías morfológicas en los arcos branquiales (Chen A, 1995). El diagnóstico de los pacientes con síndrome de BOR se basa en la presencia de síntomas clínicos clasificados como mayores y menores, según su prevalencia en los afectados, y establece una guía para su diagnóstico (Chang EH, 2004). Entre los síntomas mayores se encuentra las anomalías branquiales, sordera, fositas auriculares y problemas renales. Síntomas menores son malformaciones del oído externo, medio o interno, asimetría facial y problemas del paladar. Siguiendo este criterio, los pacientes de BOR deben tener 3 síntomas clínicos mayores, dos síntomas mayores y al menos dos menores, o un síntoma mayor y un familiar de primer grado afectado.

El 40% de los pacientes de BOR presentan mutaciones en el gen *EYA1* (MIM601653) (Abdelhak S, 1997). En este gen se han descrito mutaciones puntuales, así como pequeñas y grandes deleciones causantes de la enfermedad (Vervoort VS 2002, Chang EH, 2004). Además, se ha descrito una deleción recurrente de gran tamaño que incluye al gen *EYA1* y otros 7 genes colindantes (Brophy PD, 2013). Mutaciones en los genes *SIX1* (MIM601205) y *SIX5* (MIM600963) también son causantes del síndrome de BOR en una menor proporción (Kochhar A. 2008, Hoskins BE. 2007). Aunque la implicación de *SIX5* en este síndrome está siendo cuestionada (Krug P, 2011).

5. Nuevas tecnologías en el campo de la sordera

Lo que caracteriza la era de la post-genómica es la gran cantidad de información que se puede obtener de las nuevas tecnologías. Han surgido diversos tipos de herramientas, y aprovecharlas para trabajar en el campo de la sordera, dada su gran heterogeneidad genética, es algo que marcará un antes y un después en el diagnóstico de las hipoacusias.

5.1. Array de Hibridación Comparativa del Genoma: array CGH

5.1.1. Tecnología del array CGH

La tecnología de los arrays de ADN se basa en la capacidad de hibridación de las cadenas complementarias de ADN descrita por Watson y Crick en 1953. (Watson JD. 1953). La aplicación de esta capacidad de hibridación del ADN en la técnica del Southern Blot descrita por Edwin Southern en el año 1975 (Southern EM. 1975) supuso

el siguiente paso para el descubrimiento de los arrays de ADN. El Southern Blot permite detectar la presencia de una secuencia determinada de ADN en una mezcla compleja, gracias a una electroforesis en gel de agarosa que separa las secuencias de ADN por tamaños, y la posterior transferencia de las moléculas de ADN a una membrana en la que se lleva a cabo una hibridación in situ con la sonda radiactiva o marcada luminiscentemente complementaria a la cadena de ADN a detectar. La capacidad de inmovilizar sondas en una superficie sólida y en una disposición regular y prefijada, permitió la aparición de los primeros miniarrays (Cox KH. 1999). Tras la mejora de la resolución gracias al aumento de la densidad de sondas imprimidas en dicha superficie surgieron los microarrays (Lyndroos K. 2002). Las superficies donde inmovilizar las sondas pueden ser membranas de nitrocelulosa o superficies lisas recubiertas de compuestos capaces de unir ADN, como la polilisina.

Existen diversos tipos de arrays, según el objetivo que persigamos. Concretamente, entre los arrays de ADN se pueden encontrar arrays de SNP, que permiten identificar polimorfismos de una única base entre las muestras biológicas a comparar, o los arrays basados en hibridación comparativa del genoma (CGH) cuyo objetivo es detectar variaciones en el número de copias de ADN entre las muestras biológicas a comparar. Este último tipo de array es el que ha centrado nuestra atención en este trabajo, dadas las limitaciones que presentaban otras técnicas descritas hasta el momento. Concretamente, queremos determinar la integridad del genoma de los pacientes, y así detectar deleciones o duplicaciones en su material genómico que pudieran ser la causa de la hipoacusia diagnosticada clínicamente; y técnicas como el MLPA no nos permiten tener la precisión necesaria.

El proceso de preparación de un array CGH (Comparative Genomic Hybridization) se describe en la Figura 2. Los resultados se representan en un sistema de coordenadas, donde el eje de ordenadas representa la posición cromosómica de las sondas, y el eje de abscisas representa el logaritmo en base dos del cociente entre la intensidad del marcador rojo y el verde ($\log_2[\text{rojo/verde}]$). En aquellas regiones de ADN que contengan el mismo número de copia en las dos muestras (probando y control), el escáner leerá una señal de color rojo y otra de color verde de la misma intensidad, por lo que al solapar las dos imágenes veremos una señal lumínica amarilla, y el software de análisis lo representará en el eje de abscisas en el valor cero (no hay diferencias entre el número de copias de las dos muestras). Cuando haya una duplicación en la muestra

problema, la señal roja captada por el escáner será de mayor intensidad que la señal verde, mientras que cuando la muestra problema contenga una delección, la señal verde será más intensa que la roja. Tras el análisis del software informático, las delecciones serán representadas como valores negativos en el eje de abscisas (delección en heterocigosis tiene un \log_2 ratio de -1, una delección en homocigosis tiene un \log_2 ratio de -2), mientras que las duplicaciones se representarán como valores positivos. (Una duplicación tiene un valor \log_2 ratio de 0,5. Una muestra con 4 copias de material genético tendría un valor de \log_2 ratio es 1...).

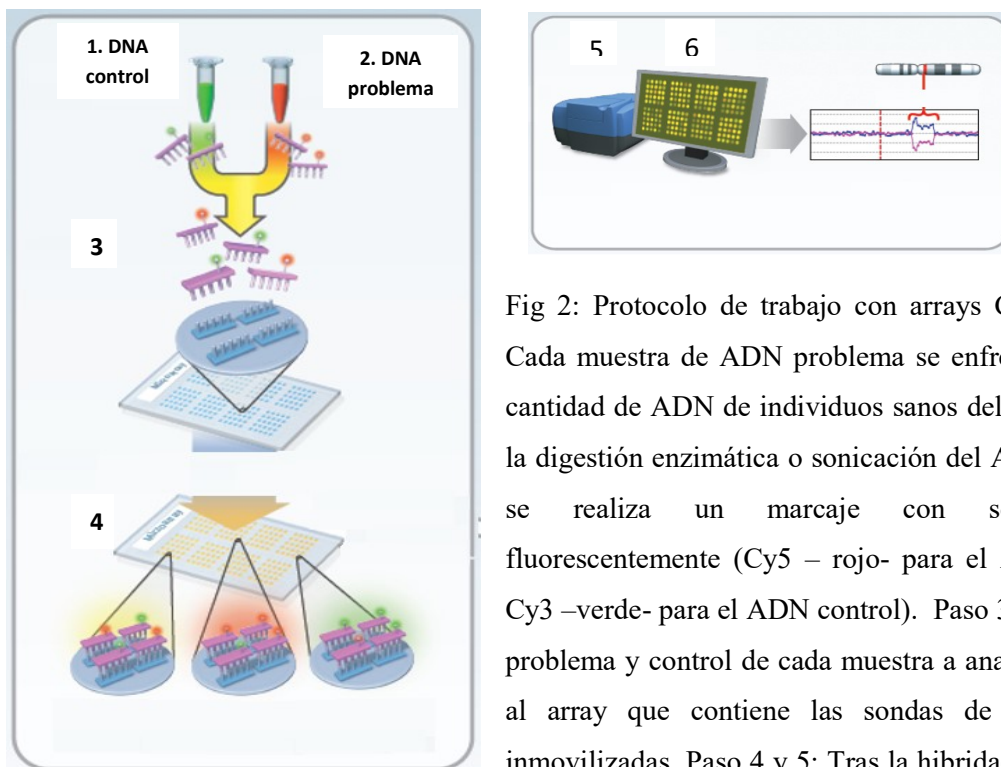


Fig 2: Protocolo de trabajo con arrays CGH. Paso 1 y 2: Cada muestra de ADN problema se enfrenta con la misma cantidad de ADN de individuos sanos del mismo sexo. Tras la digestión enzimática o sonicación del ADN por separado, se realiza un marcaje con sondas marcadas fluorescentemente (Cy5 – rojo- para el ADN problema, y Cy3 –verde- para el ADN control). Paso 3: Se junta el ADN problema y control de cada muestra a analizar y se hibridan al array que contiene las sondas de ADN a estudiar inmovilizadas. Paso 4 y 5: Tras la hibridación y los lavados, necesarios del array para eliminar las sondas que no han hibridado o que lo han hecho de forma inespecífica, un escáner leerá las señales lumínicas resultantes de la excitación de los fluoróforos. Paso 6: un software informático convertirá estas señales lumínicas en información procesada y normalizada para su análisis.

5.1.2. Aplicación del array CGH al campo de la sordera

La estrategia clásica de determinación del diagnóstico genético de la hipoacusia se ha centrado en la búsqueda de mutaciones puntuales en las muestras de los pacientes afectados. A pesar de ello, aún existe un elevado porcentaje de pacientes de hipoacusia cuya causa genética se desconoce. La ampliación de conocimientos en el ámbito de la genética, ha demostrado que las mutaciones puntuales no son la única causa de una

enfermedad genética. Grandes o pequeñas variaciones en el número de copia del material genético, deleciones o duplicaciones a veces imposibles de detectar por la tradicional técnica de secuenciación, ha hecho necesaria la utilización de nuevas técnicas en el cribado rutinario de las muestras. Y un ejemplo de ellas es el aCGH. Pocos estudios existen aún relacionados con variaciones en el número de copia en el ámbito de la hipoacusia no sindrómica, tan solo se ha descrito un caso en el que la hipoacusia familiar es debida a la deleción completa del gen *POU4F3* (Freitas EL. 2014, Rosenberg C. 2015). Además, hay grupos de investigación que están analizando posibles genes candidatos causantes de hipoacusia por variación en el número de copia mediante estas técnicas (Catelani 2009; Mingroni Netto R.C. 2011).

5.2. Secuenciación masiva: Next Generation Sequencing (NGS)

5.2.1. Tecnología de la NGS

Las técnicas de secuenciación nos permiten conocer el orden concreto de los nucleótidos que forman una cadena de ADN, en la cual se encuentra codificada la información genética de un organismo. Las primeras secuencias de ADN fueron obtenidas en los años 70. Dos técnicas fueron las más empleadas: la secuenciación química de Maxam y Gilbert (Maxam and Gilbert 1977), y la secuenciación por terminadores de Sanger (Sanger F. 1977).

El primer paso para reducir costes y tiempo en la obtención de secuencias fue la automatización de las técnicas de secuenciación, gracias a la posibilidad de detección de los fragmentos de ADN marcados covalentemente con sondas fluorescentes (Smith LM 1986). El método de secuenciación que primó en esta primera generación de secuenciadores de ADN fue el método Sanger, debido a la mayor seguridad que otorgaba el menor uso de reactivos químicos tóxicos y de radiactividad.

Utilizando como base esta tecnología, dos grupos de investigación independientes secuenciaron y ensamblaron la secuencia completa del genoma humano. El Proyecto de financiación público Genoma Humano dirigido por el Doctor Francis Collins se publicó en Nature tras 10 años de trabajo (Lander ES. 2001), y el proyecto financiado por la corporación privada Celera fue publicado en la revista Science tras 3 años de investigación (Venter JC. 2001).

La secuenciación del genoma humano marcó un hito en la historia de la genética, pero aun así era necesario el continuo desarrollo de las técnicas de secuenciación, dadas las limitaciones de la tecnología desarrollada hasta el momento. La necesidad de obtener secuencias de ADN más largas, o un mayor número de secuencias al mismo tiempo, así como de mejorar la calidad de las secuencias, reduciendo el coste y el tiempo necesario para obtenerlas ha sido lo que ha dado lugar a las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS). Estos métodos prescinden de la electroforesis en gel, puesto que esta técnica limita el tamaño y número de las secuencias con las que podemos trabajar.

Las plataformas de secuenciación masiva más extendidas comparten un fundamento teórico común, que se centra en la fragmentación del material genético y generación de librerías y amplificaciones clonales, de modo que se obtengan miles de copias idénticas para ser secuenciadas (Fig. 3). Las diferencias entre plataformas radican en la tecnología de cada casa comercial para obtener las secuencias resultantes de cada amplificación clonal (Tabla 1). La tecnología NGS permite secuenciar fragmentos solapantes, por lo que cada nucleótido puede estar incluido en lecturas diferentes; lo que otorga profundidad a la secuenciación y mejora la calidad del resultado obtenido.

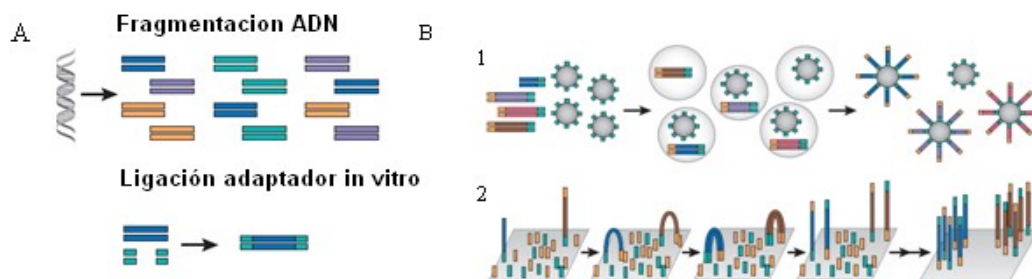
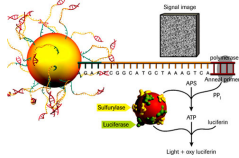
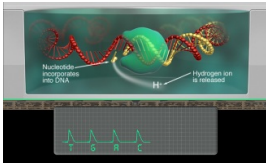
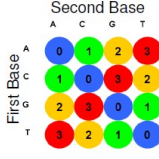
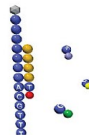


Fig 3: Protocolo general de secuenciación masiva. A. Generación de la librería. El ADN es fragmentado y, a través de una ligación in vitro, se unen unos adaptadores específicos de cada plataforma a sus extremos. B. Amplificación de las librerías. Los adaptadores añadidos permiten aislar cada uno de los fragmentos generados, y realizar amplificaciones clonales utilizando como cebadores secuencias de ADN complementarias a dichos adaptadores. Existen dos métodos principales de aislar los fragmentos, (1) en la superficie de bolas (beads), por lo que la amplificación se conoce como PCR en emulsión (técnica utilizada en las plataformas de Roche y Life Technologies), o (2) en la superficie de un sustrato liso (células de flujo), proceso en el que la amplificación recibe el nombre de PCR en forma de puentes (Plataforma Illumina). Por último tendrá lugar la reacción de secuenciación propiamente dicha, que consistirá en varios ciclos de procesos enzimáticos (diferente para cada plataforma comercial), adquisición de imágenes y generación de datos (Shendure y Ji. 2008).

| Plataforma | Preparación librería | Tecnología de Secuenciación | Secuenciadores |
|----------------------------------|-------------------------|--|---|
| Roche | PCR en emulsión (beads) | Secuenciación por síntesis: Pirosecuenciación + Cámara fotosensible  | GS-FLX (454) Genera 700Mb de lecturas totales 1.000.000 lecturas/carrera de un tamaño medio de 793pb |
| | | | GS-Junior Genera 35- 70 Mb de lecturas totales 100.000lecturas/carrera de hasta 400-700pb de longitud |
| Life Technologies | PCR emulsión (beads) | Secuenciación por síntesis: Chips de semiconductores + Placa sensible al pH  | Ion PGM (Ion Torrent) genera lecturas de entre 200 y 400 pb de tamaño, y según el chip que utilice: Chip314: 30 - 100Mb de lecturas totales Chip316: 300Mb - 1Gb de lecturas totales Chip318: 600Mb - 2Gb de lecturas totales |
| | | | Proton genera 10Gb de lecturas totales de 200pb de tamaño |
| Applied Biosystems (Life Techn.) | PCR en emulsión (beads) | Secuenciación por ligación: Dinucleótidos marcados con fluorocromos  | SOLiD: 700.000lecturas/carrera 5500W: Genera 80-160Gb delecturas totales de 75 pb de longitud si se leen en una dirección, o de 50 pb si se leen en las 2 direcciones 5500x1W: Genera 160-320 Gb de lecturas totales (según su longitud) |
| Illumina | PCR en sustrato | Secuenciación por síntesis: dNTPs marcados con fluorescencia  | HiSeq Hay varias versiones que generan entre 10 y 1500Gb de lecturas totales de entre 125-250 pb de longitud (puede leer en ambos sentidos) |
| | | | NextSeq Genera entre 20Gb-120Gb lecturas totales de 150pb de longitud (lee en ambos sentidos) |

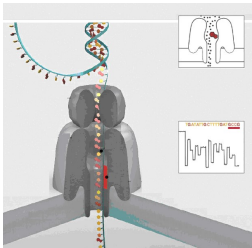
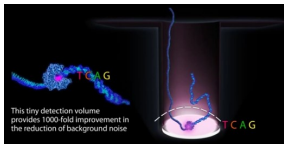
| | | | |
|----------|---|--|---|
| | | | <p>Miseq</p> <p>Genera entre 300Mb-15Gb lecturas totales de hasta 300pb de longitud (puede leer en ambos sentidos)</p> |
| Nanopore | Secuenciación de cadena sencilla de ADN | <p>Polímero intacto de ADN de cadena sencilla que atraviesa una proteína en forma de poro (nanoporo). Las bases son identificadas al modificar el flujo de iones que atraviesan el poro.</p>  | <p>Esta tecnología está siendo evaluada en varios laboratorios a nivel internacional</p> <p>MinION</p> <p>Genera entre 2.5M y 4.4 M de lecturas de 10kb de longitud (Longitud máxima reportada 230kb)</p> <p>PromethION</p> <p>Genera entre 14.5M y 26M de lecturas de 10kb de longitud</p> <p>GridION</p> <p>(en desarrollo)</p> |
| PacBio | Secuenciación de cadena sencilla de ADN | <p>Secuenciación de una única molécula en tiempo real. El complejo ADN-polimerasa y el ADN molde están inmovilizados en los pocillos. Los nucleótidos añadidos están marcados con fluoróforos para su detección.</p>  | <p>SMRT (Single Molecule-Real Time Sequencing) cell</p> <p>Genera 500Mb-1Gb de lecturas totales por pocillo</p> <p>Tamaño medio de las lecturas 10kb (longitud máxima conseguida 60kb)</p> |

Tabla 1: Tecnología de secuenciación de nueva generación empleada en cada una de las casas comerciales más utilizadas en la actualidad, y descripción de sus secuenciadores.

5.2.2. Captura de secuencia

Las técnicas de captura de secuencia surgieron ante la necesidad de delimitar la región génica a secuenciar, y con el objetivo de mejorar su calidad de secuenciación. La captura nos permite seleccionar las regiones génicas que queremos secuenciar, con el fin de enriquecer su presencia en el ADN de partida, y de este modo evitar perder recursos de secuenciación en regiones complicadas o innecesarias para nuestro experimento. Igualmente, este enriquecimiento permite que regiones complejas del ADN, por su alto contenido en GC o por sus secuencias repetitivas, que nos interesen sean secuenciadas con mayor probabilidad de éxito. Un último beneficio de la captura de secuencia radica en la disminución del coste medio de la secuenciación por muestra, ya que al seleccionar las regiones de interés, la profundidad de secuencia es mayor con un menor número de ciclos de secuenciación, y podemos aprovechar la misma carrera de secuencia para analizar varios individuos (Craig DW. 2008).

Existen dos tecnologías diferentes de captura de secuencia, según si se fundamentan en técnicas de hibridación o no (Lin X 2012). Las técnicas de captura basadas en métodos de hibridación son las más extendidas, y son las que se han utilizado para secuenciar exomas completos. Entre ellas se encuentran la captura de secuencia basada en técnicas de hibridación en fase líquida (Fig 4), como la utilizada por las casas comerciales Nimblegen (SeqCap EZ Library) o Illumina (TruSeq), que utilizan sondas de ADN; o la casa comercial Agilent (SureSelect), que utiliza sondas de ARN. También existen técnicas de captura de secuencia basada en hibridación en fase sólida, en las cuales las sondas se encuentran inmovilizadas en una superficie sólida. Esta última está menos desarrollada debido a que su implementación en sistemas automatizados es más compleja.

5.2.2.1. Tecnología Haloplex

Las reacciones de captura de secuencia basada en hibridación suelen completarse en dos días, lo que alarga el tiempo necesario para llevar a cabo la secuenciación de las muestras. Ante la necesidad de acortar el tiempo de trabajo, y obtener los resultados lo antes posible, surge la tecnología de captura Haloplex (Agilent), que permite enriquecer todas las muestras para secuenciar en un solo tubo (permite trabajar con hasta 96 muestras al mismo tiempo), y en tan solo 6 horas de

trabajo. (Fig. 5). Esta tecnología de enriquecimiento de secuencia es compatible con los secuenciadores Life Technologies e Illumina.

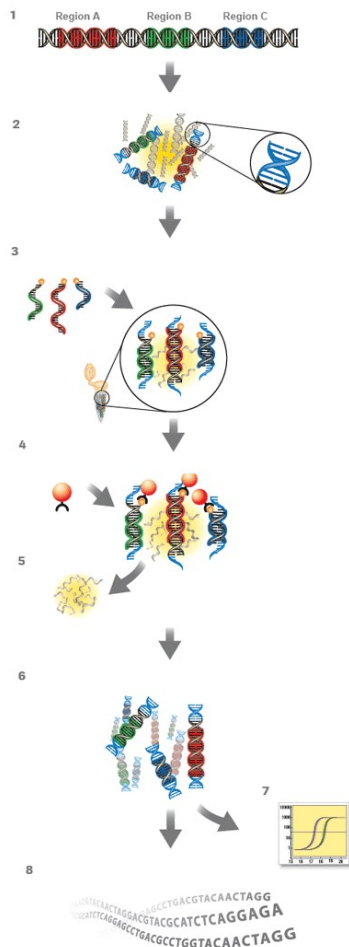
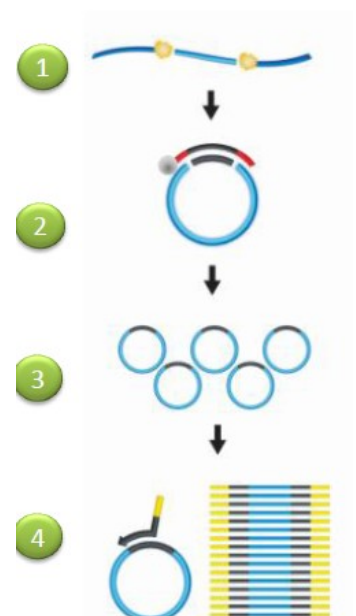


Fig 4: Captura de secuencia basada en tecnología de hibridación en fase líquida (Nimblegen: SeqCap EZ Library). (1) Las sondas de captura son sondas de ADN biotiniladas y complementarias a las regiones génicas a enriquecer. (2) Preparación de la librería. El ADN es fragmentado y se le añaden adaptadores a los extremos (3) Las sondas son hibridadas frente a la librería del ADN a capturar. (4) La captura se lleva a cabo con bolas de estreptavidina que se unen a la biotina de las sondas de ADN, y por tanto seleccionan las regiones capturadas. (5) La estreptavidina es seleccionada gracias a un soporte magnético, por lo que los fragmentos de ADN no capturados son eliminados en los lavados. (6) A continuación se amplifican por PCR las regiones capturadas, (7) se mide la calidad del enriquecimiento, y (8) se procede con la secuenciación de las muestras.

Fig. 5: Protocolo de enriquecimiento de secuencia mediante la tecnología Haloplex. 1. Digestión del ADN genómico. 2. Hibridación de las sondas. Se añade la librería de sondas, las cuales están biotiniladas para permitir su purificación, y contienen las secuencias de cebadores para permitir la posterior amplificación, y los códigos de barras para identificar cada muestra. Estas sondas producen la circularización de los fragmentos de ADN genómico, y la incorporación de los cebadores a dichas secuencias. 3. Purificación de las regiones de interés con bolas de estreptavidina, y ligación de las secuencias circularizadas. 4. Amplificación de los fragmentos de interés. Solo se amplifican los fragmentos circulares. Durante la amplificación se añaden unos códigos de barras a los extremos de las secuencias para permitir la identificación de las muestras tras la secuenciación.



5.2.3. Aplicación de la secuenciación masiva al campo de la sordera

La estrategia clásica de búsqueda de nuevos genes causantes de hipoacusia es el análisis de ligamiento en casos familiares con sujetos afectados de varias generaciones (Wallis C. 1988, de Kok YJ. 1995, Modamio-Hoybjor S. 2003, Modamio-Hoybjor S. 2007). Una vez descrito el nuevo gen, se analiza si mutaciones en dicho gen son las causantes de hipoacusia en otras familias aún sin diagnosticar genéticamente. Para llevar a cabo este análisis, el método tradicional es la secuenciación Sanger o dHPLC (Hildebrand MS, 2011). Este método es muy laborioso, caro y lento; puesto que cada gen puede tener un número variable de exones de diferentes tamaños. La existencia de 94 genes actualmente descritos como causantes de hipoacusia ralentiza notablemente el estudio genético de estos pacientes. La aparición de la secuenciación masiva y la captura de secuencia suponen una mejora notable en el trabajo con enfermedades tan heterogéneas genéticamente como las hipoacusias hereditarias, ya que reducen el tiempo y coste de trabajo, al poder secuenciar en una misma carrera varios genes, independientemente de su tamaño. Además, permite analizar varios pacientes al mismo tiempo, y seleccionar los genes que queramos, de manera que podemos priorizar los genes que nos interesen porque sean causantes ya descritos como asociados a la enfermedad y también explorar posibles genes candidatos. Ya existen en el mercado iniciativas a nivel internacional para estudiar de forma simultánea los genes causantes de hipoacusia, así como comparaciones entre ellas (Shearer AE. 2012). La diferencia entre unas plataformas y otras radica en el número de genes estudiados y la tecnología de secuenciación utilizada. Algunos ejemplos son la plataforma OtoSCOPE® (Shearer AE. 2010), OtoGenetics Ot-IDv1, OtoGenomeTM.

La secuenciación masiva también ha permitido la identificación de nuevos genes, gracias a la secuenciación de exomas en familias cuyo pequeño tamaño no permitía el estudio por análisis de ligamiento. De este modo se han descrito 21 nuevos genes entre el año 2010 y 2015 (Vona B. 2015).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1 Diseño y validación de un array CGH dirigido a genes asociados a hipoacusia hereditaria: OTO-CGH-array.
- 2 Diseño y validación de un sistema de captura de secuencia en solución de los genes asociados a hipoacusia hereditaria para NGS: OTO-NGS-Panel.
- 3 Transferencia a mercado de los diseños validados: OTO-CGH-array y OTO-NGS-Panel
- 4 Estudio genético de 110 pacientes con hipoacusia de herencia autosómica dominante mediante la herramienta diagnóstica OTO-NGS-Panel.
- 5 Identificación del gen asociado a la hipoacusia DFNA49 utilizando nuevas tecnologías: aCGH y NGS.
- 6 Estudio genético de pacientes con el Síndrome de Stickler.
- 7 Estudio genético de pacientes con el Síndrome de BOR.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes

Los individuos con hipoacusia incluidos en ese estudio pertenecen a familias de origen español. Todos ellos fueron sometidos a una exploración clínica para determinar el grado y tipo de hipoacusia, descartar los factores ambientales como causa de la sordera, y confirmar la ausencia de cualquier anomalía sindrómica. Solo se incluyeron en este estudio individuos pertenecientes a familias con hipoacusia de herencia autosómica dominante. Pacientes con características clínicas compatibles con el síndrome de Stickler y síndrome Branqui-Oto-Renal fueron también incluidos en el estudio. De cada participante se obtuvo el consentimiento informado aceptado por el comité ético y una muestra de sangre de la que se extrajo el DNA por el método salino (Miller SA. 1988).

2. Herramientas de nueva generación

2.1. Microarrays

2.1.1. Array de Hibridación Comparativa del Genoma (aCGH)

Se han diseñado 4 microarrays CGH diferentes. Los dos primeros consisten en diseños modulares que permiten abordar todos los genes y loci causantes de hipoacusia descritos hasta el momento utilizando la tecnología Agilent (4x180K). Un primer módulo cubre los genes causantes de hipoacusia de herencia autosómica dominante (AD). El segundo módulo cubre los genes causantes de hipoacusia de herencia recesiva (AR) y ligados al cromosoma X. El tercer microarray cubre los genes causantes de hipoacusia de herencia autosómica dominante utilizando la tecnología Nimblegen (12x270K). El segundo módulo que correspondería a los genes de hipoacusia de herencia autosómica recesiva estudiados con esta tecnología no pudo desarrollarse debido a que la compañía clausuró esta línea de mercado. El cuarto microarray fue diseñado con tecnología Nimblegen cubriendo la región del locus DFNA49 (12x135K). Para el diseño de los microarrays con tecnología Agilent se utilizó la plataforma e-array de Agilent (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>). Las sondas fueron diseñadas según el genoma de referencia hg19, y se utilizaron sondas ISCA CGH180K para generar un fondo de sondas que barrieran todo el genoma de forma homogénea. Todos los diseños

generados hasta obtener el definitivo fueron comprobados utilizando el visor UCSC (Universidad de California Santa Cruz).

Los microarrays fueron procesados siguiendo el protocolo de la casa comercial, y el análisis de los resultados se realizó utilizando el software Agilent Genomic Workbench, limitando los cambios detectados a aquellos que estuvieran formados por un número mínimo de 3 sondas consecutivas que se desviaran en ± 0.35 del cero. Los cambios en el número de copia detectados fueron contrastados con la base de datos DGV (Database Genomic Variants), y comparados entre pacientes e individuos sanos con el objetivo de generar una base de datos con los resultados obtenidos.

Los microarrays de Nimblegen fueron diseñados con el objetivo de cubrir las mismas regiones de interés que las empleadas en el microarray de Agilent, y su cobertura fue comprobada en el mismo visor UCSC. Estos microarrays fueron procesados y analizados en la plataforma del Institute for Research in Biomedicine (IRB: Functional Genomics Core de Barcelona) con el software SignalMap v1.9 y el software DEVA.

2.2. Secuenciación Masiva (NGS)

2.2.1. Sistema de captura líquida utilizando la tecnología Nimblegen

Los diseños fueron realizados en colaboración con la casa comercial Nimblegen utilizando las coordenadas de los genes causantes de hipoacusia no sindrómica obtenidas de publicaciones científicas. Se desarrollaron dos sistemas de captura complementarios: uno cubre los genes causantes de hipoacusia de herencia autosómica dominante y ligados al cromosoma X, y el otro cubre con los genes de hipoacusia de herencia autosómica recesiva. Los diseños iniciales fueron comprobados y modificados con el visor UCSC hasta la obtención del diseño definitivo. La captura fue llevada a cabo siguiendo los protocolos de la casa comercial en las instalaciones del Centro Andaluz de Secuenciación Genómica Humana (CASEGH de Sevilla) y la secuenciación fue llevada a cabo en un secuenciador SOLiD 5500xl.

2.2.2. Sistema de enriquecimiento de secuencia utilizando la tecnología Haloplex

Este diseño cubre todos los genes causantes de hipoacusia en un solo módulo, y fue realizado utilizando el software SureDesign de Agilent. La cobertura de las regiones de interés fue analizada en el visor UCSC, y aquellas regiones que el programa no incluía por no estar correctamente descritas en las bases de datos fueron introducidas

manualmente para ser cubiertas con otras sondas. Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo de la casa comercial, y la secuenciación se realizó en un secuenciador Miseq.

2.2.3. Análisis y tratamiento de los resultados obtenidos por secuenciación masiva

Los datos obtenidos de ambas tecnologías de Secuenciación masiva fueron analizados en diferentes plataformas. Con respecto al análisis de los datos obtenidos de la captura con tecnología Nimblegen, el alineamiento se realiza con el software BFAST, y la selección y anotación de variantes con GATK Variant Annotator y el software SeattleSeq (<http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation138/>). Los datos obtenidos de la captura con tecnología Haloplex fueron analizados con el software DNA-Nexus versión 2013. Este Software realiza el alineamiento utilizando el BWA-MEM 0.7, y la selección de variantes y su anotación con el software FreeBayes v.9.9.13 y GATK Variant Annotator. Las variantes resultantes fueron analizadas con la herramienta ANNOVAR (<http://wannovar2.usc.edu/>), y confirmadas manualmente. Los ficheros BAM resultado de ambas secuenciaciones fueron utilizados para visualizar y confirmar las variantes obtenidas en el software IGV2.3. Estas variantes fueron seleccionadas por estar en menos de un 1% en las bases de datos (1000 genomas del 1000 Genomes Project, 6500 exomas del Exome Sequencing Project, 65000 exomas del ExAC y 404 exomas del CIBERER Exome Server), y no estar representadas en la base de datos que se ha ido generando con los pacientes analizados.

2.2.4. Secuenciación del exoma completo de 3 individuos afectados de la familia DFNA49

Esta secuenciación del exoma completo (Whole Exome Sequencing, WES) fue llevada a cabo en el CNAG (Centro Nacional de Análisis Genómico).

3. Estudios genético-moleculares de validación

3.1. Amplificación por PCR

Los cebadores para amplificar los exones y zonas intrónicas flanqueantes de los genes en estudio fueron diseñados utilizando el software Oligo 4.0 (Molecular Biology Insights, West Cascade, CO, USA) (Material Suplementario). La amplificación se llevo

a cabo usando 10 pmoles de cada oligo, 1,5 µl de tampón de reacción 10X, 2,5 nmoles de dNTPs, 0,75 U de polimerasa (Fast Start, Roche), 1,5 mM de MgCl₂ y 20 ng de DNA genómico, todo ello en un volumen de 15 µl. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystem) y el programa 150-TD:

0. 95°C 5 min
1. (95° 30s/(T^a+5) 15s/72° 30s)-1°C/ciclo (x5 ciclos)
2. (95° 30s/T^a 15s/72° 30s) x 30 ciclos
3. 72°C 5 min

Los amplificados de PCR fueron comprobados en una electroforesis horizontal en gel de Agarosa al 1,5% en tampón TBE 1% con bromuro de etidio o Greensafe (Nzytech), visualizándose las bandas a la luz ultravioleta.

3.2. Secuenciación Sanger

Los amplificados de PCR fueron purificados utilizando 2µl de ExoSAP-IT (Affimetrix) por cada 5 µl de amplificado. La secuenciación se llevo a cabo utilizando 10 pmoles de uno de los oligos utilizados en la amplificación, junto con 2µl de terminador de secuencia BigDye v1.1 de Applied Biosystems, 4µl de tampón de reacción 5X, 4µl del purificado de PCR y agua hasta completar el volumen total de 20µl. El programa de secuencia se llevó a cabo en un termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystem):

4. 96°C 3 min
5. (96°C 10s / 50°C 5s / 60°C 4 min) x 25 ciclos

Las secuencias obtenidas fueron precipitadas con etanol/acetato, y analizadas en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). El análisis de las secuencias se realizó mediante el programa informático Seqman II 5.03 o Chromas Lite v.2.1.

3.3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

El diagnóstico de deleciones en los pacientes de BOR fue llevado a cabo utilizando utilizando el kit MLPA de la casa MRC-Holland P-153 para el gen *EYAI*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

3.4. Análisis de ligamiento mediante uso de microsatélites

Para confirmar la segregación de los alelos afectados en pacientes del Síndrome de Stickler se utilizaron marcadores microsatélites disponibles en los mapas genéticos Marshfield, Genethon o DeCODE (Material Suplementario).

Los marcadores microsatélite se amplificaron en cada individuo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo que se utilizaron oligonucleótidos (uno por pareja) conjugados en 5' con una de estas tres moléculas fluorescentes: TET, FAM o HEX (Roche). En la mezcla de reacción de PCR se añadieron: 10 pmoles de cada oligo, 1.5 µl de tampón de reacción 10X, 2.5 nmoles de dNTPs, 0.75 U de polimerasa (Fast Start, Roche), 1.5 mM de MgCl₂ y 20 ng de DNA genómico, todo ello en un volumen de 15 µl. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Geneamp 9700 (Applied Biosystem) empleando el siguiente programa:

6. 94 °C 5 min.
7. (94°C 40 s, 56 °C 40 s) x 30 ciclos.
8. 72 °C 7 min.

Los amplificados fluorescentes se desnaturalizaron en formamida y se sometieron a electroforesis capilar en un analizador automático de DNA ABI PRISMTM 310 (Applied Biosystem). Mediante el programa GeneScan (Applied Biosystem) se analizó cada muestra y se calculó la longitud de los alelos amplificados en cada caso.

3.5. Transformación bacteriana

Para aislar los alelos mutados de los individuos afectados con pequeñas duplicaciones o deleciones, clonamos la región amplificada por PCR en un plásmido pBluescript sK- o TOPO TA, y los transformamos en células competentes XL1 Blue (Stratagene). Estas células las cultivamos en medio LB con IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside) y X-gal, y bajo selección de ampicilina. Los plásmidos fueron secuenciados utilizando los cebadores universales T3 y T7 (pBluescript sK-) O M13 (TOPO TA).

3.6. RT-PCR

Para analizar el efecto de la mutación c.430-1G>A del gen *COL2A1* en el procesamiento del ARN, lo extrajimos de linfocitos de los afectados transfectados con EBV (Chan D. 1991). Los linfocitos se cultivaron en medio RPMI suplementado con

20% Suero Fetal Bovino, 1% estreptomicina y 1% glutamina. El ARN fue purificado utilizando el kit QIAamp RNA blood mini kit (Qiagen), y su retrotranscripción usando una retrotranscriptasa de alta fidelidad (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, ROCHE), y secuenciado utilizando un cebador específico. La amplificación se consiguió siguiendo una estrategia semi-anillada, utilizando el primer F3 situado en el exón 4 y R3 situado en el exón 8, y posteriormente reamplificando el producto resultante con los primers F5 situado entre el exón 5 y 6, y el primer R3.

En el resto de los casos con mutaciones encontradas que afectan a sitios del procesamiento del ARN, ante la imposibilidad de immortalizar linfocitos de los pacientes, se hizo un estudio in silico utilizando el predictor del software DBGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

RESULTADOS

RESULTADOS

A) HIPOACUSIA NO SINDRÓMICA

1. Diseño de un array CGH dirigido a genes causantes de sordera: OTO-CGH-ARRAY.

1.1 Diseño del array CGH utilizando diferentes plataformas

Hemos diseñado varios arrays CGH utilizando la tecnología Agilent o la tecnología Nimblegen, con la intención de hacer una comparativa entre los diseños y elegir, de cara a su uso en diagnóstico y su posible transferencia a mercado, el que más se adecúe a nuestras necesidades teniendo en cuenta su coste-efectividad: la tecnología Agilent o la tecnología Nimblegen.

Nos propusimos estudiar un total de 113 loci y 73 genes de hipoacusia, los cuales hemos distribuido en dos módulos según el tipo de herencia genética: 43 loci y 28 genes serán analizados en el primer módulo, para el estudio de la hipoacusia de herencia autosómica dominante, y los otros 70 loci y 45 genes serán incluidos en el segundo módulo para el estudio de hipoacusia de herencia autosómica recesiva y ligada al X. Este diseño modular permite una mayor cobertura de los genes, y que el análisis de las muestras pueda ser segregada según el tipo de herencia familiar. Para facilitar la validación de las plataformas se ha incluido el gen *EYAI* en ambos diseños. La delección total o parcial de este gen es causante del Síndrome de BOR (Vervoort VS. 2002, Sánchez-Valle A. 2010).

Utilizando **la tecnología Agilent**, elegimos el formato de array 4x180K. Con este formato analizamos cuatro pacientes en un mismo microarray y disponemos de 180.000 sondas para analizar cada paciente. Decidimos hacer una distribución no homogénea de las sondas entre genes y loci para analizar con mayor detalle las regiones génicas conocidas. Además, cubrimos 1Mb de región génica flanqueando los genes conocidos (regiones 5'UTR y 3'UTR) con una densidad de sondas intermedia entre la densidad de los genes y la densidad de los loci, con la intención de no perder posible información de interés (promotores, regiones reguladoras...). Dado que los genes con los que trabajamos tienen un tamaño que varía entre 77pb y 480kb, nos vemos obligados a dividir los genes en dos grupos que cubriremos con densidades de sondas diferentes, los

que tienen un tamaño menor de 100kb estarán cubiertos con una mayor densidad de sondas, y los que tienen un tamaño mayor de 100kb estarán cubiertos con una densidad de sondas menor con respecto al otro grupo de genes. En la figura 6 se muestra la densidad de sondas resultante de cada una de las regiones en el array para genes de herencia autosómica dominante (AD), así como para los genes de herencia autosómica recesiva (AR). En la tabla 2 y 3 se encuentran los listados de los genes y loci AD y AR respectivamente incluidos en el estudio.

La distribución de sondas en las regiones de interés se realiza a través de un programa informático (SureDesign), y la distancia existente entre sondas es un dato estadístico, ya que no todas las sondas van a encontrarse exactamente a la misma distancia unas de otras. Revisamos el diseño teórico final para comprobar la cobertura de los genes que nos interesan, y comprobamos la existencia de numerosos exones en nuestros genes de interés sin ninguna sonda que los cubriera, de modo que para no perder información relevante, como pequeñas delecciones o inserciones, decidimos incluir una última premisa en el diseño, que se incluyera al menos una sonda en cada uno de estos exones. Aun así, por limitaciones de la tecnología, en el diseño final quedan exones que no han podido ser cubiertos por ninguna sonda, debido a que no existen sondas disponibles de acuerdo al software de diseño de Agilent en esas zonas en concreto (Tabla 4), por ser zonas complejas debido a que son ricas en Guaninas y Cisteínas, o por ser regiones repetitivas. Estas regiones tan solo representan el 0.26% del total de las regiones exónicas.

| | | | | |
|---|-------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|
| A | DFNA | GEN | TAMAÑO (pb) | Referencia |
| | DFNA2 | <i>GJB3</i> | 5176 | Xia 1998 |
| | | <i>KCNQ4</i> | 54676 | Kubisch 1999 |
| | DFNA44 | <i>CCDC50</i> | 69584 | Modamio-Hoybjor 2007 |
| | DFNA6 | <i>WFS1</i> | 33414 | Bespalova 2001, Young 2001 |
| | DFNA39 | <i>DSPP</i> | 8344 | Xiao 2001 |
| | DFNA15 | <i>POU4F3</i> | 1496 | Vahava 1998 |
| | DFNA13 | <i>COL11A2</i> | 29776 | McGuirt 1999 |
| | DFNA5 | <i>DFNA5</i> | 59665 | Van Laer 1998 |
| | DFNA50 | MIRN96 | 77 | Mencia 2009 |
| | | *MIR182-96-183 | 4631 | |
| | DFNA11 | <i>MYO7A</i> | 86976 | Liu 1997 |
| | DFNA12 | <i>TECTA</i> | 88138 | Verhoeven 1998 |
| | DFNA48 | <i>MYO1A</i> | 21588 | Donaudy 2003 |
| | DFNA25 | <i>SLC17A8 (VGLUT3)</i> | 64979 | Ruel 2008 |
| | DFNA64 | <i>DIABLO</i> | 19858 | Cheng 2011 |
| | DFNA3 | <i>GJB2/GJB6</i> | 44930 | Denoyelle 1998, Grifa 1999 |
| | DFNA9 | <i>COCH</i> | 20518 | Robertson 1998 |
| | DFNA40 | <i>CRYM</i> | 64222 | Oshima 2006 |
| | DFNA20 | <i>ACTG1</i> | 2828 | Zhu 2003, Van Wijk 2003 |
| | DFNA4 | <i>CEACAM16</i> | 11626 | Zheng 2011 |

| | | | | |
|---|-------------|------------------------|--------------------|-------------------|
| B | DFNA | GEN | TAMAÑO (pb) | Referencia |
| | DFNA1 | <i>DIAPH1</i> | 104033 | Lynch 1997 |
| | DFNA22 | <i>MYO6</i> | 170345 | Melchionda 2001 |
| | DFNA10 | <i>EYA4</i> | 290762 | Wayne 2001 |
| | DFNA28 | <i>TFCP2L3 (GRHL2)</i> | 177282 | Peters 2002 |
| | DFNA51 | <i>TJP2</i> | 133900 | Walsh 2010 |
| | DFNA36 | <i>TMC1</i> | 314550 | Kurima 2002 |
| | DFNA4 | <i>MYH14</i> | 106916 | Donaudy 2004 |
| | DFNA17 | <i>MYH9</i> | 106739 | Lalwani 2000 |
| | CONTROL1 | <i>EYA1</i> | 164797 | Vervoort 2002 |

Tabla 2: Genes y loci AD incluidos en el diseño aCGH, indicando su tamaño y referencias bibliográficas. A. Genes AD con un tamaño menor de 100Kb. B. Genes AD con un tamaño mayor de 100Kb. C. Loci AD incluidos en los diseños aCGH indicando el número de genes descritos que contienen como causantes de sordera. Existen varios loci sin coordenadas incluidas en la tabla anterior debido a que la megabase añadida flanqueando al gen descrito en dicho locus sobrepasa sus coordenadas por ambos extremos (MYH9 –DFNA17- y CRYM –DFNA40-). * miR182-96-183: incluido en el diseño aCGH de Nimblegen.

C

| LOCUS | Número de genes | Referencia |
|----------------|--------------------------|---|
| DFNA2 | 2 | Coucke 1994, Xia 1998 |
| DFNA49 | 0 | Moreno-Pelayo 2003 |
| DFNA7 | 0 | Fagerheim 1996 |
| DFNA34 | 0 | Kurima 2000 |
| DFNA43 | 0 | Flex 2003 |
| DFNA16 | 0 | Fukushima 1999 |
| DFNA18 | 0 | Bönsch 2001 |
| DFNA44 | 1 | Modamio-Hoybjor 2003 |
| DFNA6 /14 / 38 | 1 | Lesperance 1995 |
| DFNA24 | 0 | Häfner 2000 |
| DFNA42 /52 | 0 | Xia 2002 |
| DFNA1+54+15 | 1 (DFNA1), 0 (DFNA54) | DFNA1: Lynch 1997, DFNA54:Gürtler 2004 |
| DFNA15 | 1 | DFNA15: Vahava 1998 |
| DFNA31 | 0 | Snoeckx 2004 |
| DFNA13 | 1 | Brown 1997 |
| DFNA22 | 1 | Melchionda 2001 |
| DFNA10 | 1 | O'Neill 1996 |
| DFNA5 | 1 | Van Camp 1995 |
| DFNA50* | 1 (miR96) | Modamio-Hoybjor 2004 |
| | 3 (miR182-96-183) | |
| DFNA28 | 1 | Peters 2002 |
| DFNA47 | 0 | D'Adamo 2003 |
| DFNA51 + 36 | 1 (DFNA51) | DFNA51: Walsh 2010 |
| DFNA36 | 1 | Kurima 2002 |
| DFNA59+11 | 0 (DFNA59) 1 (DFNA11) | DFNA59: Chatterjee 2009, DFNA11: Tamagawa 1996 |
| DFNA12 /8 | 1 | Verhoeven 1997 |
| DFNA48 | 1 | D'Adamo 2003, Donaudy 2003 |
| DFNA25 | 1 | Greene 2001 |
| DFNA64 | 1 | Cheng 2011 |
| DFNA41 | 0 | Blanton 2002 |
| DFNA3 | 2 | Chaïb 1994, Grifa 1999 |
| DFNA33 | 0 | Bönsch 2009 |
| DFNA53+9 | 0 (DFNA53) | DFNA53: Yan 2006 |
| DFNA9 | 1 | Manolis 1996 |
| DFNA23 | 0 | Salam 2000 |
| DFNA30 | 0 | Mangino 2001 |
| DFNA20 /26 | 1 | Morell 2000, DeWan 2003 |
| DFNA57 | 0 | Bönsch 2008 |
| DFNA4 | 2 | Chen 1995, Mirghomizadeh 2002 |

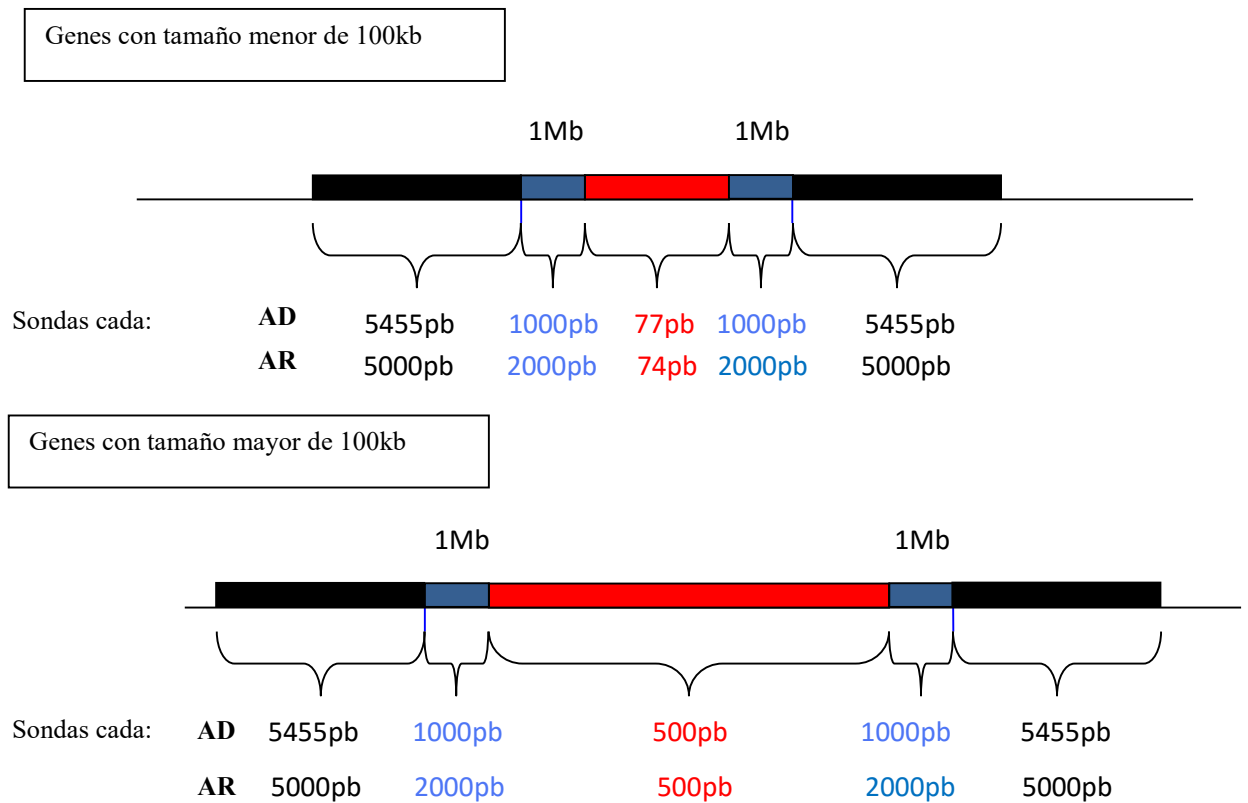


Fig 6: Densidad media de sondas en los genes (marcados en rojo), megabases flanqueando los genes (azul), y loci (con o sin gen conocido: negro) causantes de hipoacusia no síndrómica autosómica dominante (AD) y recesiva (AR) del array CGH utilizando la tecnología Agilent.

A

| DFNB | GEN | TAMAÑO (pb) | Referencia |
|--------------|---------------------|-------------|-----------------------|
| DFNB32/82 | <i>GPSM2</i> | 57354 | Walsh T. 2010 |
| DFNB73 | <i>BSND</i> | 9847 | Riazuddin S. 2009 |
| DFNB36 | <i>ESPN</i> | 36155 | Naz S. 2004 |
| DFNB21 | <i>TECTA</i> | 88138 | Mustapha M. 1999 |
| DFNB18 | <i>USH1C</i> | 50520 | Ouyang XM. 2002 |
| | <i>OTOG</i> | 60670 | Schraders M. 2012 |
| DFNB63 | <i>LRTOMT/COMT2</i> | 30445 | Ahmed ZM. 2008 |
| DFNB2 | <i>MYO7A</i> | 86976 | Weil D. 1997 |
| DFNB1 | <i>GJB2</i> | 5508 | Kelsell DP. 1997 |
| | <i>GJB6</i> | 10432 | Grifa A. 1999 |
| DFNB22 | <i>OTOA</i> | 82214 | Zwaenepoel I. 2002 |
| DFNB3 | <i>MYO15A</i> | 71095 | Wang A. 1998 |
| DFNB15/72/95 | <i>GIPC3</i> | 7969 | Charizopoulou N. 2011 |
| DFNB59 | <i>PJVK</i> | 9944 | Delmaghani S. 2006 |
| DFNB8/10 | <i>TMPRSS3</i> | 24204 | Scott HS. 2001 |
| DFNB28 | <i>TRIOBP</i> | 90218 | Riazuddin S. 2006 |
| DFNB42 | <i>ILDR1</i> | 34859 | Borck G. 2011 |
| DFNB6 | <i>TMIE</i> | 9590 | Naz S. 2002 |
| DFNB49 | <i>MARVELD2</i> | 28893 | Riazuddin S. 2006 |
| DFNB91 | <i>SERPINB6</i> | 24005 | Sirmaci A. 2010 |
| DFNB53 | <i>COL11A2</i> | 29776 | Chen W. 2005 |
| DFNB66/67 | <i>LHFPL5/TMHS</i> | 18781 | Shabbir M. 2006 |
| DFNB61 | <i>SLC26A5</i> | 93421 | Liu XZ. 2003 |
| DFNB4 | <i>SLC26A4</i> | 57170 | Li XC. 1998 |
| DFNB39 | <i>HGF</i> | 68007 | Schultz JM. 2009 |
| DFNB79 | <i>TPRN</i> | 9094 | Rehman AU. 2010 |
| DFNX4 | <i>SMPX</i> | 52138 | Del Castillo I. 1996 |
| DFNX2 | <i>POU3F4</i> | 1506 | De Kok YJ. 1995 |
| DFNX1 | <i>PRPS1</i> | 22601 | Liu X. 2010 |

B

| DFNB | GEN | TAMAÑO (pb) | Referencia |
|--------|---------------|-------------|--------------------|
| DFNB30 | <i>MYO3A</i> | 278463 | Walsh T. 2002 |
| DFNB23 | <i>PCDH15</i> | 1825167 | Ahmed ZM. 2003 |
| DFNB12 | <i>CDH23</i> | 418998 | Bork JM. 2001 |
| DFNB24 | <i>RDX</i> | 121832 | Khan SY. 2007 |
| DFNB74 | <i>MSRB3</i> | 188192 | Ahmed ZM. 2011 |
| DFNB84 | <i>PTPRQ</i> | 235842 | Schraders M. 2010 |
| DFNB35 | <i>ESRRB</i> | 130488 | Collin R. 2008 |
| DFNB16 | <i>STRC</i> | 129186 | Verpy E. 2001 |
| DFNB77 | <i>LOXHD1</i> | 180059 | Grillet N. 2009 |
| DFNB9 | <i>OTOF</i> | 101494 | Yasunaga S. 1999 |
| DFNB29 | <i>CLDN14</i> | 115947 | Wilcox ER. 2001 |
| DFNB98 | <i>TSPEAR</i> | 213720 | Delmaghani S. 2012 |
| DFNB25 | <i>GRXCRI</i> | 137389 | Schraders M. 2010 |

| | | | |
|----------|-------------|--------|----------------|
| DFNB37 | <i>MYO6</i> | 170345 | Ahmed ZM. 2003 |
| DFNB31 | <i>WHRN</i> | 103369 | Mburu P. 2003 |
| DFNB7/11 | <i>TMCI</i> | 314550 | Kurima K. 2002 |
| CONTROL1 | <i>EYAI</i> | 164797 | Vervoort 2002 |

C

| LOCUS | Número de genes | Referencia |
|--------------|-----------------|---|
| DFNB32/82 | 1 | Masmoudi S. 2003 |
| DFNB45 | 0 | Bhatti A. 2008 |
| DFNB73 | 1 | Riazuddin S. 2009 |
| DFNB36 | 1 | Naz S. 2004 |
| DFNB30 | 1 | Walsh T. 2002 |
| DFNB33 | 0 | Medlej-Hashim M. 2002 |
| DFNB23 | 1 | Ahmed ZM. 2003 |
| DFNB12 | 1 | Chaib H. 1996 |
| DFNB24 | 1 | Khan SY. 2007 |
| DFNB21 | 1 | Mustapha M. 1999 |
| DFNB20 | 0 | Moynihan L. 1999 |
| DFNB18 | 2 | Jain PK. 1998 |
| DFNB51 | 0 | Shaikh RS. 2005 |
| DFNB93 | 0 | Tabatabaiefar MA. 2011 |
| DFNB63 | 1 | Tlili A. 2006 |
| DFNB2 | 1 | Guilford P. 1994 |
| DFNB62 | 0 | Ali G. 2006 |
| DFNB74 | 1 | Waryah AM. 2009 |
| DFNB84 | 1 | Schraders M. 2010 |
| DFNB1 | 2 | Guilford P. 1994 |
| DFNB5 | 0 | Fukushima K. 1995 |
| DFNB35 | 1 | Ansar M. 2003 |
| DFNB16 | 1 | Campbell DA. 1997 |
| DFNB48 | 0 | Ahmad J. 2005 |
| DFNB22 | 1 | Zwaenepoel I. 2002 |
| DFNB85 | 0 | Shahin H. 2010 |
| DFNB3 | 1 | Friedman TB. 1995 |
| DFNB77 | 1 | Grillet N. 2009 |
| DFNB46 | 0 | Mir A. 2005 |
| DFNB15/72/95 | 1 | Chen A. 1997; Ain Q. 2007; Rheman AU. 2011; Charizopoulou N. 2011 |
| DFNB81 | 0 | Rehman AU. 2011 |
| DFNB68 | 0 | Santos RL. 2006 |
| DFNB27 | 0 | Pulley LJ. 2000 |
| DFNB59 | 1 | Delmaghani S. 2006 |
| DFNB9 | 1 | Chaib H. 1996 |
| DFNB47 | 0 | Hassan MJ. 2006 |
| DFNB65 | 0 | Tariq A. 2006 |
| DFNB29 | 1 | Wilcox ER. 2001 |
| DFNB8/10 | 1 | Veske A. 1996 |
| DFNB98 | 1 | Delmaghani S. 2012 |

| | | |
|--------------|---|--------------------------------|
| DFNB40 | 0 | Delmaghani S. 2003 |
| DFNB28 | 1 | Shahin H. 2006 |
| DFNB42 | 1 | Aslam M. 2005 |
| DFNB6 | 1 | Fukushima K. 1995 |
| DFNB26 | 0 | Riazuddin S. 2000 |
| DFNB25 | 1 | Schraders M. 2010 |
| DFNB55 | 0 | Irshad S. 2005 |
| DFNB49 | 1 | Ramzan K. 2005 |
| DFNB38 | 0 | Ansar M. 2003 |
| DFNB91 | 1 | Sirmaci A. 2010 |
| DFNB53 | 1 | Chen W. 2005 |
| DFNB66/67 | 1 | Tlili A. 2005; Shabbir M. 2006 |
| DFNB37 | 1 | Ahmed ZM. 2003 |
| DFNB61 | 1 | Liu XZ. 2003 |
| DFNB4 | 1 | Baldwin CT. 1995 |
| DFNB17 | 0 | Greinwald JH. 1998 |
| DFNB13 | 0 | Mustapha M. 1998 |
| DFNB44 | 0 | Ansar M. 2004 |
| DFNB39 | 1 | Wajid M. 2003 |
| DFNB14 | 0 | Mustapha M. 1998 |
| DFNB71 | 0 | Chishti MS. 2009 |
| DFNB31 | 1 | Mustapha M. 2002 |
| DFNB79 | 1 | Rehman AU. 2010 |
| DFNB7/11 | 1 | Jain PK. 1995 |
| DFNB83 | 0 | Shahin H. 2010 |
| DFN6 (DFNX4) | 1 | Del Castillo I. 1996 |
| DFN4 (DFNX3) | 0 | Lalwani AK. 1994 |
| DFN3 (DFNX2) | 1 | De Kok YJ. 1995 |
| DFN2 (DFNX1) | 1 | Lui X. 2010 |
| AUXN (DFNX5) | 0 | Wang QJ. 2006 |

Tabla 3: Genes y loci AR incluidos en el diseño aCGH, indicando su tamaño y referencias bibliográficas. A. Genes AR con un tamaño menor de 100Kb. B. Genes AR con un tamaño mayor de 100Kb. C. Loci AR incluidos en los diseños aCGH indicando el número de genes descritos como causantes de sordera que se sitúan en sus intervalos críticos.

| DFNA | GEN | Nº exones total | Nº exones sin ninguna sonda tecnología Agilent | Nº exones sin ninguna sonda tecnología Nimblegen |
|----------|------------------|-----------------|--|--|
| DFNA2 | <i>GJB3</i> | 3 | 0 | 0 |
| | <i>KCNQ4</i> | 14 | 1 | 0 |
| DFNA44 | <i>CCDC50</i> | 12 | 0 | 0 |
| DFNA6 | <i>WFS1</i> | 8 | 1 | 0 |
| DFNA39 | <i>DSPP</i> | 5 | 0 | 0 |
| DFNA1 | <i>DIAPH1</i> | 31 | 0 | 0 |
| DFNA15 | <i>POU4F3</i> | 2 | 0 | 0 |
| DFNA13 | <i>COL11A2</i> | 66 | 0 | 0 |
| DFNA22 | <i>MYO6</i> | 35 | 1 | 0 |
| DFNA10 | <i>EYA4</i> | 21 | 0 | 0 |
| DFNA5 | <i>DFNA5</i> | 11 | 1 | 0 |
| DFNA50 | MIRN96 | 1 | 0 | 0 |
| DFNA28 | <i>GRHL2</i> | 16 | 0 | 0 |
| DFNA51 | <i>TJP2</i> | 28 | 1 | 0 |
| DFNA36 | <i>TMC1</i> | 22 | 2 | 1 |
| DFNA11 | <i>MYO7A</i> | 50 | 3 | 0 |
| DFNA12 | <i>TECTA</i> | 23 | 0 | 0 |
| DFNA48 | <i>MYO1A</i> | 28 | 0 | 0 |
| DFNA25 | <i>SLC17A8</i> | 12 | 0 | 0 |
| DFNA64 | <i>DIABLO</i> | 8 | 0 | 0 |
| DFNA3 | <i>GJB2/GJB6</i> | 2/6 | 1/1 | 0 |
| DFNA9 | <i>COCH</i> | 13 | 1 | 0 |
| DFNA40 | <i>CRYM</i> | 15 | 1 | 0 |
| DFNA20 | <i>ACTG1</i> | 6 | 1 | 0 |
| DFNA4 | <i>CEACAM16</i> | 7 | 2 | 0 |
| | <i>MYH14</i> | 44 | 11 | 0 |
| DFNA17 | <i>MYH9</i> | 43 | 10 | 0 |
| CONTROL1 | <i>EYA1</i> | 16 | 0 | 0 |

Tabla 4: Genes incluidos en el diseño aCGH, número de exones que contienen dichos genes según la base de datos UCSC, y número de exones que no han podido ser cubiertos por ninguna sonda en el diseño utilizando la tecnología Agilent, y la tecnología Nimblegen.

La tecnología Nimblegen posee un formato de microarray 12x270K que nos permite analizar 12 pacientes en el mismo array, y distribuir hasta 270.000 oligos en el diseño para cada paciente. Con este formato, dado que el número de sondas reales de las que disponemos es mucho mayor, no es necesario dividir los genes por tamaños. En la figura 7 se muestra la densidad de sondas en cada una de las regiones de interés, y en la tabla 2 se indican los genes y loci incluidos en el diseño, que son los mismos que los incluidos en el aCGH-AD de Agilent, con la única variación de que en las coordenadas de miR96 se han incluido también las coordenadas de miR182 y miR183, ya que son microRNAs candidatos de causar hipoacusia, por su importante relación con miR96 (Weston MD. 2011). En este caso tan solo pudimos desarrollar el microarray de hipoacusias AD puesto que esta casa comercial cerró su línea comercial de microarrays.

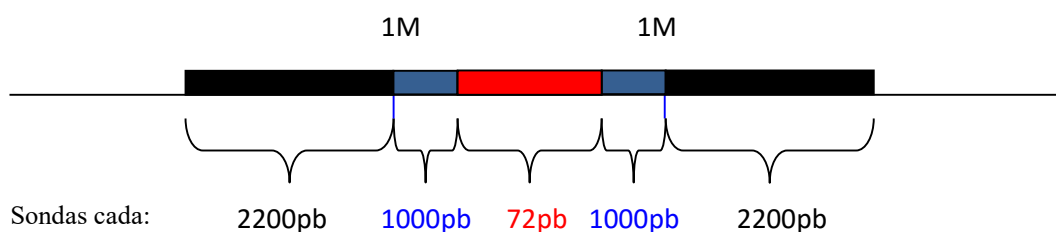


Figura 7: Distribución de sondas en el diseño aCGH utilizando la plataforma Nimblegen. Los genes causantes de hipoacusia no sindrómica autosómica dominante (rojo) poseen sondas distribuidas cada 72 pb de distancia media, las megabases que flanquean los genes (azul), contienen sondas cada 1000 pb, y el resto de región genómica de los loci incluidos en el diseño (negro), tanto si tienen gen descrito como si no, poseen sondas cada 2200 pb de distancia media.

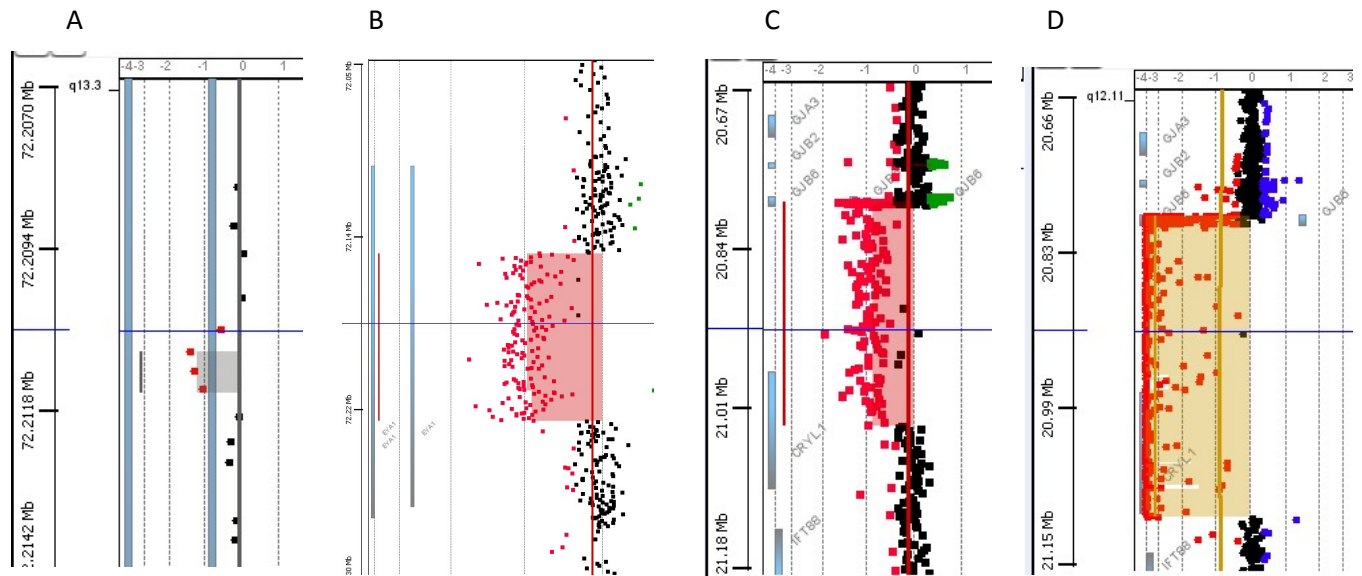
1.2 Validación de los diseños aCGH: OTO-CGH-array

Para validar los diseños de array CGH utilizamos muestras de pacientes del Síndrome Branquio-Oto-Renal (BOR) con deleciones en el gen *EYAI* ya diagnosticadas previamente mediante la técnica MLPA (Tabla 5 y Figura 8). Además, para validar el módulo de aCGH-AR de Agilent se utilizaron muestras de pacientes con deleciones en el gen *GJB6*, asociadas a hipoacusia DFNB1.

| Paciente | Diagnóstico clínico | Diagnóstico Genético | Resultado aCGH Agilent | Resultado aCGH Nimblegen |
|----------|---------------------|---|--|---|
| B14.1 | Síndrome BOR | Deleción en heterocigosis del exón 7 del gen <i>EYAI</i> | Del ex7 <i>EYAI</i> Tamaño mínimo de la deleción: 918pb | Del ex7 <i>EYAI</i> Tamaño mínimo de la deleción: 1003 pb |
| B16.2 | Síndrome BOR | Deleción en heterocigosis del exón 7-10 del gen <i>EYAI</i> | Del ex6-10 <i>EYAI</i> Tamaño mínimo de la deleción: 78408pb | - |
| S1644.2 | DFNB1 | Deleción en heterocigosis del gen <i>GJB6</i> | Del <i>GJB6</i> , <i>CRYLI</i> . Tamaño mínimo de la deleción 231100pb | - |
| S1790.1 | DFNB1 | Deleción en homocigosis del gen <i>GJB6</i> | Del <i>GJB6</i> , <i>CRYLI</i> . Tamaño mínimo de la deleción 307430pb | - |

Tabla 5: Listado de pacientes con síndrome de BOR y DFNB1 utilizados para validar el OTO-CGH-array. El paciente B14.1 fue utilizado para validar el módulo AD, mientras que el resto de pacientes se utilizaron para validar el módulo AR. (No hay datos de estos pacientes con la tecnología Nimblegen debido a que no se pudo desarrollar este módulo por falta de continuidad de dicho producto por parte de la casa comercial Nimblegen).

Como podemos observar en la tabla 5, ambas plataformas fueron capaces de detectar las deleciones en los pacientes con el Síndrome de BOR, con la única diferencia de la precisión en el tamaño de la deleción.



E

| Paciente | Coordenadas última Sonda con valor $\log_2[r/v]=0$ | Coordenadas primera Sonda con valor $\log_2[r/v]\neq 0$ | Coordenadas última Sonda con valor $\log_2[r/v]\neq 0$ | Coordenadas primera Sonda con valor $\log_2[r/v]=0$ | Tamaño mínimo de la deleción (pb) |
|----------|--|---|--|---|-----------------------------------|
| B14.1 | chr8:72210154-72210213 | chr8:72210604-72210663 | chr8:72211463-72211522 | chr8:72211853-72211912 | 918 |
| B16.2 | chr8:72150271-72150330 | chr8:72150577-72150636 | chr8:72228926-72228985 | chr8:72229209-72229268 | 78408 |
| S1644.2 | chr13:20802531-20802590 | chr13:20802973- 20803032 | chr13:21034014-21034073 | chr13:21035491-21035550 | 231100 |
| S1790.1 | chr13:20797073- 20797117 | chr13:20797139-20797198 | chr13:21104510- 21104569 | chr13:21106738-21106797 | 307430 |

Figura 8: Imágenes de deleciones detectadas en los pacientes utilizados para validar la herramienta OTO-CGH-array utilizando la tecnología Agilent (Software Genomic Workbench). A: Paciente B14.1. Deleción en heterocigosis del exón 7 del gen *EYAI*. B: Paciente B16.2. Deleción en heterocigosis de los exones 6-10 del gen *EYAI*. C: Paciente S1644.2. Deleción en heterocigosis del gen *GJB6*. D: Paciente S1790.1. Deleción en homocigosis del gen *GJB6*. E: Coordenadas de las sondas que delimitan las regiones deletadas y tamaño mínimo de las deleciones calculado como la diferencia de la primera y última sonda con un valor $\log_2[r/v]\neq 0$.

1.3 Análisis de pacientes de Hipoacusia Autosómica Dominante con OTO-CGH-array (Tecnología Agilent)

Para llevar a cabo este estudio, se estableció como parámetros de detección que las alteraciones implicasen a un número mínimo de 3 sondas consecutivas que se desviaran en ± 0.35 del cero (indicativo de que el número de copia del material genético en estudio es el correcto). Con estas condiciones, se han analizado un total de 23 pacientes de hipoacusia autosómica dominante. El número medio de CNVs detectadas en cada paciente fue de 30, y tan solo el 8% de las cuales no coinciden con CNVs descritas previamente en las bases de datos. Estas CNVs son de significado incierto y aparentemente no patogénicas puesto que coinciden con regiones intrónicas de los genes y se repiten en varios pacientes sin parentesco.

Todos los análisis realizados están sirviendo para la creación de una base de datos en la que se describen las alteraciones patogénicas y no patogénicas, y su prevalencia en este tipo de pacientes (Fig 9).

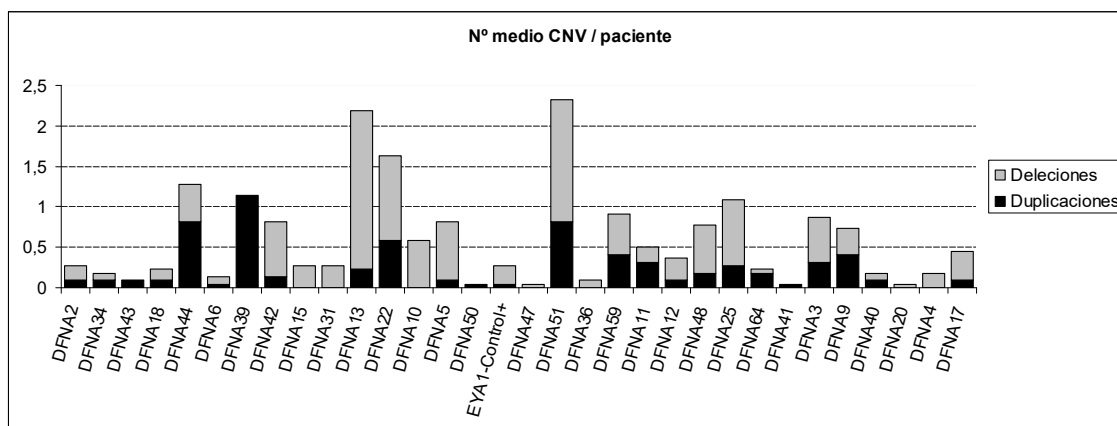


Figura 9: Número medio de CNVs encontradas en los pacientes con hipoacusia de herencia autosómica dominante distribuidos por loci. El locus DFNA13 se encuentra en el cromosoma 6, flanqueando el complejo mayor de histocompatibilidad. Esta región es la más densa en genes, y la más polimórfica del genoma humano, lo que explicaría la gran cantidad de CNVs encontradas en dicho locus, así como los loci cercanos (DFNA22 y 10).

2. Diseño de sistemas de captura dirigida a genes implicados en Sordera: OTO-NGS-PANEL

Hemos diseñado dos sistemas de captura con objetivos distintos. El sistema de captura diseñado con tecnología Nimblegen permite analizar mutaciones intrónicas profundas, ya que incluye regiones exónicas e intrónicas; mientras que el diseño utilizando la tecnología Agilent incluye las regiones exónicas de los genes seleccionados.

2.1 Tecnología Nimblegen

2.1.1 Diseño: Captura de regiones génicas

La tecnología de captura SeqCap EZ Choice Library de Nimblegen nos permite capturar regiones génicas, contiguas o no, de un tamaño de entre 100 Kb y 7 Mb. El listado de los genes incluidos se indica en la tabla 6. Hemos dividido este sistema de captura en dos módulos: El primero incluye los genes de hipoacusia AD y ligados al cromosoma X, cuyo tamaño total asciende a 2,14Mb, y el segundo incluye los genes de hipoacusia AR con un tamaño total de 5,77Mb.

Las sondas del panel de Nimblegen utilizadas para la captura de secuencia son sondas específicas, de 75pb de longitud media, y solapantes unas con otras, de modo que si hay algún error en la hibridación de una sonda a su región diana, las sondas de alrededor son capaces de cubrir esa zona.

Como hemos indicado antes, este sistema utiliza sondas que son específicas para una región dada del genoma. El diseño final se obtuvo tras varias revisiones en colaboración con el equipo bioinformático de la casa comercial Nimblegen.

A

| DFN | GEN | Cromosoma |
|-----|-----------------|-----------|
| A1 | <i>DIAPH1</i> | 5 |
| A2 | <i>KCNQ4</i> | 1 |
| A2 | <i>GJB3</i> | 1 |
| A3 | <i>GJB2</i> | 13 |
| A3 | <i>GJB6</i> | 13 |
| A4 | <i>MYH14</i> | 19 |
| A4 | <i>CEACAM16</i> | 19 |
| A5 | <i>DFNA5</i> | 7 |
| A6 | <i>WFS1</i> | 4 |
| A9 | <i>COCH</i> | 14 |
| A10 | <i>EYA4</i> | 6 |
| A11 | <i>MYO7A</i> | 11 |
| A12 | <i>TECTA</i> | 11 |
| A13 | <i>COL11A2</i> | 6 |
| A15 | <i>POU4F3</i> | 5 |
| A17 | <i>MYH9</i> | 22 |

| DFN | GEN | Cromosoma |
|-----|-------------------------|-----------|
| A20 | <i>ACTG1</i> | 17 |
| A22 | <i>MYO6</i> | 6 |
| A25 | <i>VGLUT3 (SLC17A8)</i> | 12 |
| A28 | <i>TFCP2L3 (GRHL2)</i> | 8 |
| A36 | <i>TMC1</i> | 9 |
| A39 | <i>DSPP</i> | 4 |
| A40 | <i>CRYM</i> | 16 |
| A44 | <i>CCDC50</i> | 3 |
| A48 | <i>MYO1A</i> | 12 |
| A50 | MIRN96 | 7 |
| A51 | <i>TJP2</i> | 9 |
| A64 | <i>SMAC/DIABLO</i> | 12 |
| X1 | <i>PRPS1</i> | X |
| X2 | <i>POU3F4</i> | X |
| X4 | <i>SMPX</i> | X |

B

| DFN | GEN | Cromosoma |
|-------------|----------------|-----------|
| B1 | <i>GJB2</i> | 13 |
| B1 | <i>GJB6</i> | 13 |
| B2 | <i>MYO7A</i> | 11 |
| B3 | <i>MYO15A</i> | 17 |
| B4 | <i>SLC26A4</i> | 7 |
| B6 | <i>TMIE</i> | 3 |
| B7/B11 | <i>TMC1</i> | 9 |
| B8/B10 | <i>TMPRSS3</i> | 21 |
| B9 | <i>OTOF</i> | 2 |
| B12 | <i>CDH23</i> | 10 |
| B15/B72/B95 | <i>GIPC3</i> | 19 |
| B16 | <i>STRC</i> | 15 |
| B18 | <i>USH1C</i> | 11 |
| B21 | <i>TECTA</i> | 11 |
| B22 | <i>OTOA</i> | 16 |
| B23 | <i>PCDH15</i> | 10 |
| B24 | <i>RDX</i> | 11 |
| B25 | <i>GRXCR1</i> | 4 |
| B28 | <i>TRIOBP</i> | 22 |
| B29 | <i>CLDN14</i> | 21 |
| B30 | <i>MYO3A</i> | 10 |

| DFN | GEN | Cromosoma |
|---------|---------------------|-----------|
| B31 | <i>WHRN</i> | 9 |
| B32 | <i>GPSM2</i> | 1 |
| B35 | <i>ESRRB</i> | 14 |
| B36 | <i>ESPN</i> | 1 |
| B37 | <i>MYO6</i> | 6 |
| B39 | <i>HGF</i> | 7 |
| B42 | <i>ILDR1</i> | 3 |
| B49 | <i>MARVELD2</i> | 5 |
| B53 | <i>COL11A2</i> | 6 |
| B59 | <i>PJVK</i> | 2 |
| B61 | <i>SLC26A5</i> | 7 |
| B63 | <i>LRTOMT/COMT2</i> | 11 |
| B66/B67 | <i>LHFPL5/TMHS</i> | 6 |
| B73 | <i>BSND</i> | 1 |
| B74 | <i>MSRB3</i> | 12 |
| B77 | <i>LOXHD1</i> | 18 |
| B79 | <i>TPRN</i> | 9 |
| B84 | <i>PTPRQ</i> | 12 |
| B91 | <i>SERPINB6</i> | 6 |
| B18 | <i>OTOG</i> | 11 |
| B98 | <i>TSPEAR</i> | 21 |

Tabla 6: Genes incluidos en el diseño de captura de secuencia SeqCap EZ Choice Library de Nimblegen. A) Genes hipoacusia de herencia AD y ligados al cromosoma X. B) Genes de hipoacusia AR.

2.1.2 Validación del diseño utilizando la plataforma de secuenciación SOLiD (Life Technologies)

Para llevar a cabo la validación de este diseño, se secuenciaron 12 muestras utilizando un secuenciador SOLiD xl W (se realizaron lecturas en una sola dirección de reads de 75 pb). Estas muestras tenían mutaciones previamente detectadas por secuenciación Sanger, las 6 primeras se utilizaron para validar el diseño de captura de genes AD, y las 6 últimas para validar el diseño de captura de genes AR (Tabla 7).

La calidad de las secuencias obtenidas fue elevada en todas las muestras. Se obtuvo una profundidad de secuencia media de 150x, el 90% de las lecturas mapean en la región capturada, y el 80% de las secuencias capturadas tienen una profundidad mayor de 20x (Figura 10). El número medio de variantes obtenidas por muestra es de 5500, y el protocolo de trabajo es el indicado en la figura 11.

| Muestra | Gen | Mutación | % wt / mut | Nº lecturas wt / mut |
|---------|----------------|------------------------|------------|----------------------|
| 1 | <i>CCDC50</i> | p.Lys476Glu | 38/82 | 64/138 |
| 2 | <i>TECTA</i> | p.Arg1890Cys | 35/65 | 78/145 |
| 3 | miR96 | hsa-pre-miR96 (+14C>A) | 52/48 | 75/66 |
| 4 | <i>GJB3</i> | p.Leu116Arg | 47/53 | 89/100 |
| 5 | <i>POU4F3</i> | p.Ala78Thr | 65/35 | 149/80 |
| 6 | <i>TMC1</i> | c.45C>T | 58/42 | 189/137 |
| | | IVS14+85T>C | 63/37 | 254/149 |
| | | c.1713C>T | 53/47 | 165/146 |
| 7 | <i>OTOF</i> | p.Gln829* | 94/6 | 33/2 |
| 8 | <i>TMC1</i> | p.Asp15Asp | 53/47 | 70/62 |
| 9 | <i>GJB2</i> | 35delG | 79/21 | 71/19 |
| | | p.Arg143Trp | 57/43 | 68/58 |
| 10 | <i>SLC26A4</i> | p.Glu413Pro | 50/50 | 43/43 |
| | | p.Leu445Trp | 52/48 | 64/60 |
| 11 | <i>OTOG</i> | p.Pro2116Leu | 59/41 | 40/28 |
| | | p.Arg2187* | 77/23 | 43/13 |
| 12 | <i>TECTA</i> | p.Cys1517Arg | 49/451 | 34/36 |

Tabla 7: Muestras utilizadas para validar las herramientas de captura de secuencia diseñada con tecnología Nimblegen y secuenciada en una plataforma SOLiD xl W. Todos los cambios esperados fueron detectados. En la tabla se indica el porcentaje de lecturas con la mutación y sin ella, y el número de lecturas de cada variante. *TECTA* (NM_005422), *CCDC50* (NM_178335), *TMC1* (NM_138691), *GJB3* (NM_024009), *POU4F3* (NM_002700), *OTOF* (NM_194248), *GJB2* (NM_004004), *SLC26A4* (NM_000441), *OTOG* (NM_001277269).

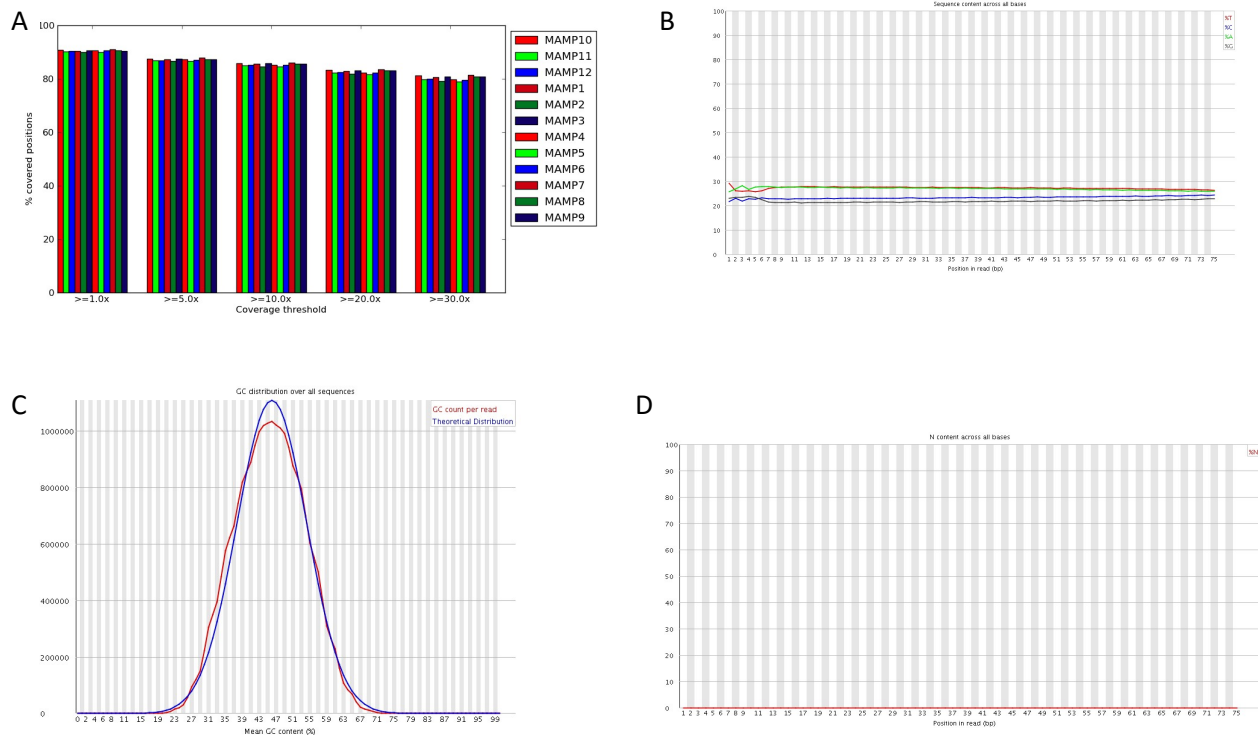


Figura 10: Calidad de los resultados obtenidos de la secuenciación de 12 muestras capturadas utilizando la tecnología Nimblegen y secuenciadas en una plataforma SOLiD xl W. A. La calidad de las muestras indica que más del 80% de las muestras tienen una cobertura mayor de 20x, y todas las muestras son muy homogéneas entre sí. B. El porcentaje de bases nucleotídicas es el mismo a lo largo de toda la secuencia. C. No hay diferencia entre el porcentaje de GC esperado y el obtenido en el diseño. D. El contenido de bases nucleotídicas sin identificar (N) es prácticamente nulo en todas las muestras y a lo largo de toda su secuencia.

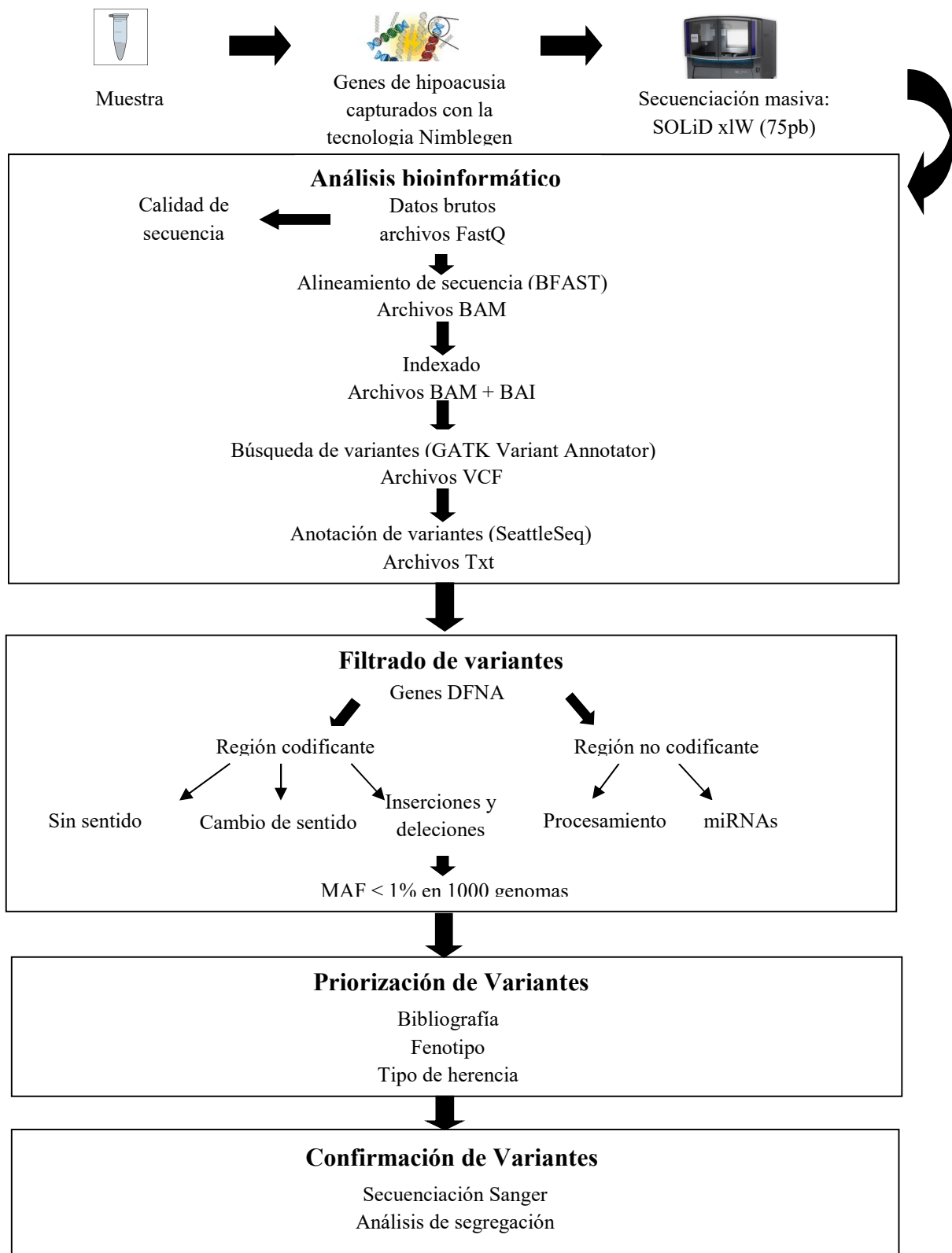


Figura 11: Protocolo de trabajo seguido para secuenciar cada una de las muestras de pacientes de hipoacusia AD capturadas con tecnología Nimblegen y secuenciadas en una plataforma SoliDx1W, indicando el análisis bioinformático de los resultados de la secuenciación masiva, y el filtrado empleado para el estudio de las variantes obtenidas.

2.2 Tecnología Agilent: Haloplex

2.2.1 Diseño: Captura de regiones exónicas: OTO-NGS-Panel

La ventaja de utilizar la tecnología Haloplex radica en la rapidez de generar una librería con las regiones que queremos secuenciar, proceso que requiere 10 horas en lugar de los tres días de trabajo de la generación de librerías con otras tecnologías. Además, nos ha permitido mezclar las librerías de hasta 16 pacientes y secuenciarlas en una misma carrera en el secuenciador MiSeq. El formato de menor tamaño para diseñar la captura de secuencia Haloplex es de 500 Kb, lo que nos ha permitido incluir todos los genes causantes de hipoacusia no sindrómica identificados hasta la fecha en una sola captura, ya que el tamaño teórico de la región a capturar es de 459,247 Kb. En la tabla 8 se indican los genes que se han incluido en este diseño de captura de secuencia.

2.2.2 Validación utilizando la plataforma de secuenciación MiSeq (Illumina)

La validación de este diseño se llevó a cabo con las mismas muestras que las utilizadas en la validación del diseño anterior, alcanzando una sensibilidad del 100% (tabla 9 y figura 12). La validación de la captura de muestras recesivas se llevó a cabo por otro grupo de trabajo del laboratorio bajo la supervisión del Dr. Ignacio del Castillo, por lo que no se incluyen en este trabajo.

| Muestra | Gen | Mutación | % wt / mut | Nº lecturas wt/mut |
|----------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|
| 1 | <i>CCDC50</i> (DFNA44) | p.Lys476Glu | 50/50 | 125/125 |
| 2 | <i>TECTA</i> (DFNA8/A12) | p.Arg1890Cys | 70/30 | 175/75 |
| 3 | hs-mir96 (DFNA50) | hsa-pre-miR-96 (+14C>A) | 52/48 | 126/117 |
| 4 | <i>GJB3</i> | p.Leu116Arg | 87/13 | 203/30 |
| 5 | <i>POU4F3</i> (DNFA15) | p.Ala78T | 47/53 | 118/131 |

Tabla 9: Muestras de herencia autosómica dominante utilizadas para validar el diseño de captura de tecnología Haloplex (Agilent) y secuenciadas en un secuenciador MiSeq. En la tabla se indica el porcentaje y número de lecturas detectadas con la variante silvestre y con la mutación. *CCDC50* (NM_178335), *TECTA* (NM_005422), *GJB3* (NM_024009), *POU4F3* (NM_002700).

| DFN | GEN |
|----------------|-----------------|
| A1 | <i>DIAPH1</i> |
| A2 | <i>KCNQ4</i> |
| A2 | <i>GJB3</i> |
| A3 / B1 | <i>GJB2</i> |
| A3 / B1 | <i>GJB6</i> |
| A4 | <i>MYH14</i> |
| A4 | <i>CEACAM16</i> |
| A5 | <i>DFNA5</i> |
| A6 | <i>WFS1</i> |
| A9 | <i>COCH</i> |
| A10 | <i>EYA4</i> |
| A11 / B2 | <i>MYO7A</i> |
| A12 / B21 | <i>TECTA</i> |
| A13 / B53 | <i>COL11A2</i> |
| A15 | <i>POU4F3</i> |
| A17 | <i>MYH9</i> |
| A20 | <i>ACTG1</i> |
| A22 / B37 | <i>MYO6</i> |
| A25 | <i>SLC17A8</i> |
| A28 | <i>GRHL2</i> |
| A36 / B7 / B11 | <i>TMC1</i> |
| A40 | <i>CRYM</i> |
| A41 | <i>P2RX2</i> |
| A44 | <i>CCDC50</i> |
| A48 | <i>MYO1A</i> |
| A50 | <i>MIR96</i> |
| | <i>MIR183</i> |
| | <i>MIR182</i> |
| A51 | <i>TJP2</i> |
| A64 | <i>DIABLO</i> |
| B3 | <i>MYO15A</i> |
| B4 | <i>SLC26A4</i> |
| B6 | <i>TMIE</i> |
| B8/B10 | <i>TMPRSS3</i> |
| B9 | <i>OTOF</i> |
| B12 | <i>CDH23</i> |

| DFN | GEN |
|-----------------|-----------------|
| B15 / B72 / B95 | <i>GIPC3</i> |
| B18 | <i>USH1C</i> |
| B18B | <i>OTOG</i> |
| B22 | <i>OTOA</i> |
| B23 | <i>PCDH15</i> |
| B24 | <i>RDX</i> |
| B25 | <i>GRXCR1</i> |
| B28 | <i>TRIOBP</i> |
| B29 | <i>CLDN14</i> |
| B30 | <i>MYO3A</i> |
| B31 | <i>DFNB31</i> |
| B32 | <i>GPSM2</i> |
| B35 | <i>ESRRB</i> |
| B36 | <i>ESPN</i> |
| B39 | <i>HGF</i> |
| B42 | <i>ILDR1</i> |
| B48 | <i>CIB2</i> |
| B49 | <i>MARVELD2</i> |
| B59 | <i>DFNB59</i> |
| B61 | <i>SLC26A5</i> |
| B63 | <i>LRTOMT</i> |
| B66 / B67 | <i>LHFPL5</i> |
| B73 | <i>BSND</i> |
| B74 | <i>MSRB3</i> |
| B77 | <i>LOXHD1</i> |
| B79 | <i>TPRN</i> |
| B84 | <i>PTPRQ</i> |
| B84 | <i>OTOGL</i> |
| B91 | <i>SERPINB6</i> |
| B93 | <i>CABP2</i> |
| B98 | <i>TSPEAR</i> |
| | <i>USH2A</i> |
| X | <i>PRPS1</i> |
| X | <i>POU3F4</i> |
| X | <i>SMPX</i> |

Tabla 8: Genes incluidos en el diseño de captura de secuencia utilizando la tecnología Haloplex de Agilent. Los genes DSPP y STRC no han sido añadidos debido a que este sistema de captura no es capaz de capturar más del 50% de las regiones exónicas de dichos genes.

Para cada muestra se han obtenido una media de 2.6 Millones de lecturas, con una profundidad media de 200X y una profundidad mínima media en cada una de las regiones capturadas de 22X. El 90% de las lecturas mapean en la región capturada, y el 82% de las secuencias capturadas y que mapean en la región de interés tienen una profundidad mayor de 30x. El número medio de cambios obtenidos con la tecnología Haloplex es de 1166 cambios por muestra, y el protocolo de trabajo utilizado para analizar los pacientes con este diseño se indica en la figura 13.

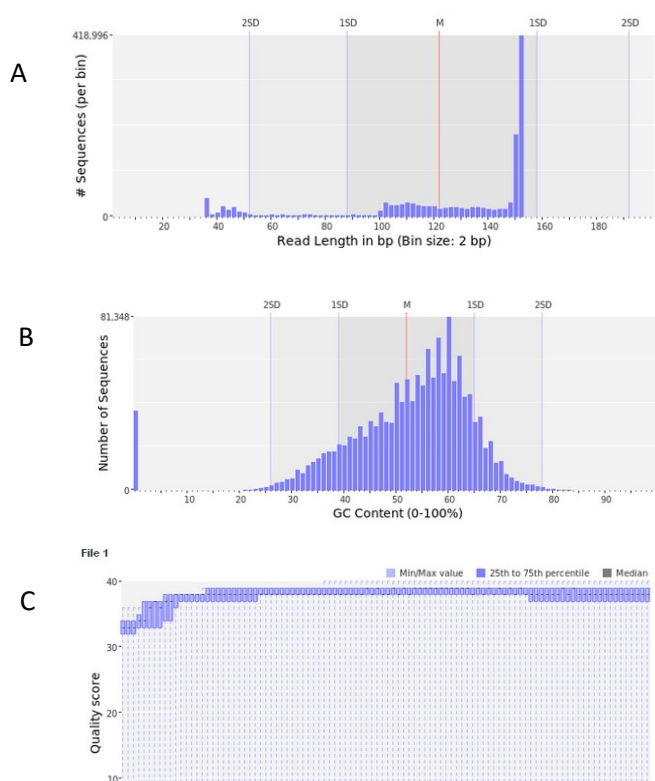


Figura 12: Calidad de las lecturas obtenidas tras la captura de secuencia con la tecnología Haloplex, y la secuenciación en un MiSeq. A. El tamaño en pares de bases de las lecturas obtenidas es 150pb ya que el secuenciador utilizado genera lecturas de dicho tamaño (2x150). B. Contenido medio en GC en las lecturas obtenidas. C. Calidad media de cada una de las bases según su posición en las lecturas generadas. Todas las bases tienen una calidad mínima de Q30.

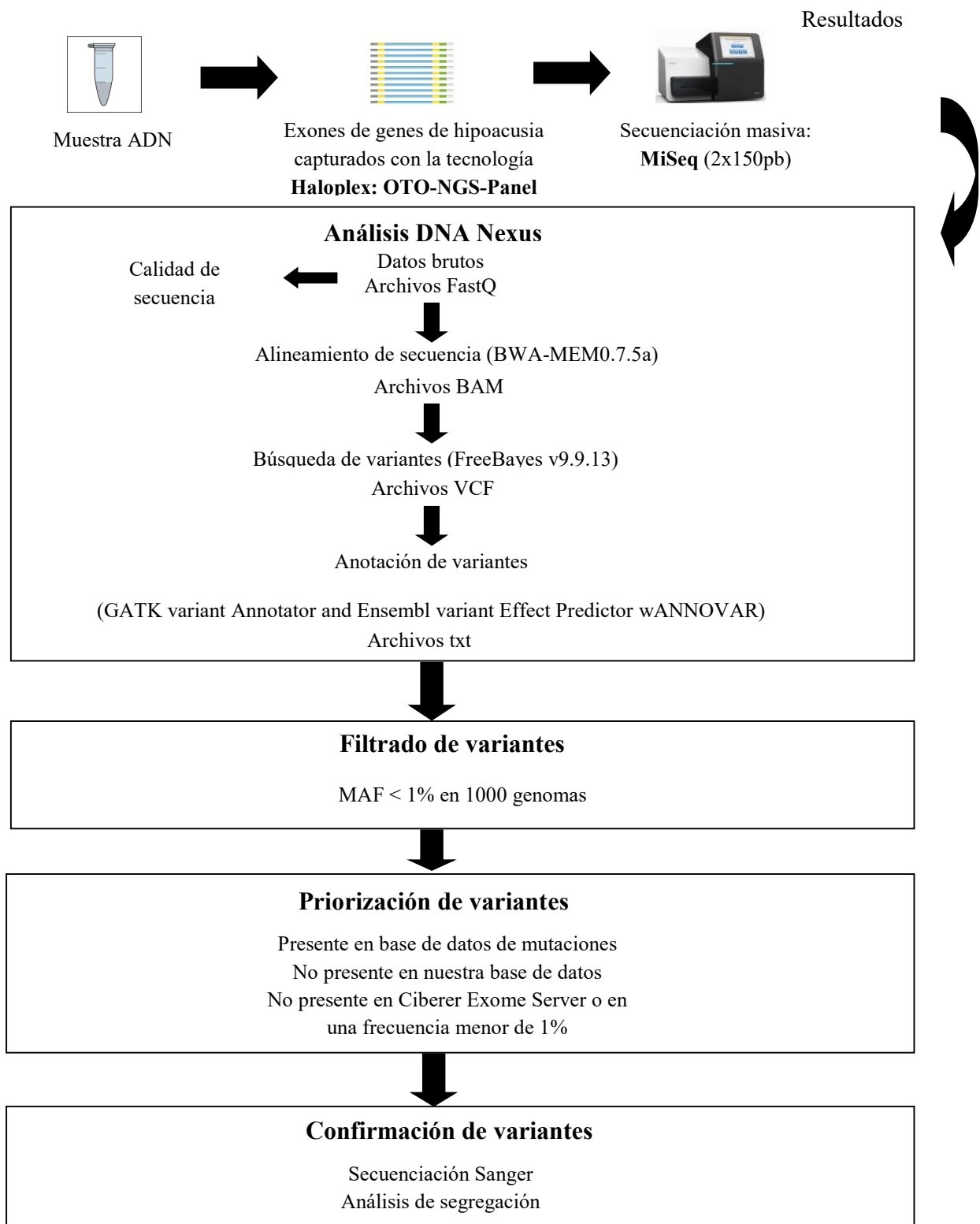


Figura 13: Protocolo de trabajo seguido para secuenciar cada una de las muestras de pacientes de hipoacusia de herencia autosómica dominante con tecnología Haloplex (OTO-NGS-Panel), indicando el análisis bioinformático de los resultados de la secuenciación masiva, y el filtrado empleado para el estudio de las variantes obtenidas.

2.3 Comparación de los resultados obtenidos por ambas tecnologías

La calidad de las lecturas obtenidas en cada una de las dos tecnologías es similar, con alrededor del 90% de las lecturas mapeando en las regiones deseadas. Ambos diseños tienen una calidad similar a la de diseños comerciales.

Pero las regiones a capturar son diferentes: la tecnología Nimblegen captura todos los genes de hipoacusia conocidos hasta la fecha en un diseño modular: el primer diseño analiza una región de 2.1Mb (incluyendo regiones exónicas e intrónicas de todos los genes de hipoacusia dominantes y con herencia ligada al cromosoma X), y el segundo diseño analiza una región de 5.7Mb ((incluyendo regiones exónicas e intrónicas de todos los genes de hipoacusia recesivos). Por otro lado, la tecnología Haloplex captura en un solo tubo 500Kb (incluyendo regiones exónicas de todos los genes de hipoacusia conocidos hasta la fecha). Para hacer una comparación entre los resultados obtenidos en cada una de las dos tecnologías, solo incluimos aquellos cambios exónicos de los genes de hipoacusia AD que se encuentren en los dos diseños, y el resultado es el indicado en la tabla 10.

| Muestra Haloplex | Nº total cambios | | Nº cambios exónicos | | | |
|-----------------------------|-------------------------|------------------|----------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Haloplex | Nimblegen | Haloplex | Nimblegen | Nº cambios comunes | % cambios comunes |
| 1 | 1175 | 1933 | 48 | 42 | 42 | 87,5% |
| 2 | 1137 | 1811 | 49 | 42 | 41 | 83,6% |
| 3 | 1145 | 1682 | 39 | 37 | 37 | 94,8% |
| 4 | 1171 | 2026 | 47 | 45 | 45 | 95,7% |
| 5 | 1161 | 2084 | 48 | 46 | 46 | 95,8% |

Tabla 10: Comparación del número total de cambios detectados tras la captura y secuenciación de las muestras analizadas por las dos tecnologías (Nimblegen y Haloplex), y de cambios exónicos (cambios sin sentido, con cambio de sentido y de alteración del marco de lectura) en los genes de herencia autosómica dominante incluidos en los dos diseños. Las dos últimas columnas indican los cambios exónicos comunes en ambas tecnologías. En esta tabla puede observarse que el número total de cambios es mayor en la tecnología Nimblegen, debido a que el diseño con esta tecnología cubre las regiones intrónicas de los genes, mientras que el número de cambios exónicos detectados es mayor en la tecnología Haloplex.

Así mismo, el número de cambios comunes se corresponde en 4 de las 5 muestras con el número de mutaciones encontrado en el diseño de captura de tecnología Nimblegen. En la tabla 11 se indica la causa por la cual ciertas mutaciones no se han encontrado en alguno de los dos diseños. El 65% de ellas se han perdido por falta de cobertura en el diseño de secuenciación de Nimblegen, mientras que no se ha encontrado ninguna mutación que no aparezca en Haloplex por falta de cobertura. El resto son errores de secuenciación de alguna de las 2 tecnologías.

| Muestra | Falta cobertura Nimblegen | Artefacto secuenciación Haloplex | Artefacto secuenciación Nimblegen | Significado incierto | TOTAL |
|----------------|--------------------------------------|---|--|---------------------------------|--------------|
| 1 | 4 | 1 | 0 | 1 | 6 |
| 2 | 6 | 1 | 1 | 0 | 8 |
| 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |

Tabla 11: Estudio de la causa de que algunas mutaciones hayan sido encontradas en la secuenciación de una de las dos tecnologías empleadas, pero no en la otra (Nimblegen o Haloplex). Las mutaciones clasificadas como artefactuales son las que se han encontrado en menos de un 15% de lecturas en una de las dos tecnologías, y ninguna lectura en la otra. Las mutaciones clasificadas como de significado incierto son debidas a que este porcentaje es superior al 15% de lecturas. La mutación considerada artefactual en la tecnología Haloplex es la misma en las 4 muestras de la tabla, y la misma que la mutación de significado incierto en la muestra 4 (chr5:140907222G>T que supone una mutación con cambio de sentido el gen *DIAPH1* (NM_001079812) p.Lys1055Thr). Tras la secuenciación Sanger se observó que esta mutación no era real en ninguna de las muestras.

Dados los resultados anteriores, es muy importante tener en cuenta cuáles son las regiones que los diseños no cubren de manera satisfactoria, centrándonos principalmente en las regiones exónicas, puesto que son las que se utilizarán para el diagnóstico de los pacientes, y que deberán ser incluidas en un fichero como regiones no estudiadas, y tratar de cubrirlas de un modo más eficiente en futuras mejoras de los diseños. En nuestros diseños estas regiones suponen un 2.9% en la captura Nimblegen y un 0.28% en la captura Haloplex.

3. Transferencia a mercado de los diseños validados: OTO-NGS-panel y OTO-CGH-array

Los diseños generados son trasladables a la práctica clínica. Por ello, estos resultados son objeto de firma de un contrato de explotación comercial. Tras estudiar el mercado y las posibles opciones se ha firmado un contrato de explotación comercial para los diseños OTO-CGH-array (diseño modular con tecnología Agilent) y OTO-NGS PANEL (kit de captura con tecnología Haloplex) con la empresa Genycell Biotech. Este contrato otorga a dicha empresa una licencia de comercialización y explotación del know-how y base de datos asociada con carácter de exclusividad y una duración de 3 años.

4. Estudio genético de 110 pacientes con hipoacusia AD mediante OTO-NGS-Panel

Se han analizado un total de 110 muestras de hipoacusia de herencia autosómica dominante con la tecnología Haloplex. En la figura 14 se representa el número de cambios medio obtenido en cada paciente por gen y tipo de mutación.

Un reto en el proceso de confirmación de variantes ha sido determinar qué variantes eran patogénicas y cuáles benignas. Nuestro método de filtrado se basó en que las variantes estuvieran presentes en menos del 1% de la población de estudio. En nuestro proceso de filtrado pasábamos de una media de 1200 variantes por muestra a 4 candidatas contrastando los resultados con las bases de datos 1000 genomas y 6500 exomas. Pero para llegar al resultado final ha sido básica la utilización de la base de datos de población española Ciberer Exome Server, generada por el CiberER y que actualmente cuenta con datos de 404 individuos españoles.

El número medio de mutaciones candidatas encontradas en los pacientes estudiados siguiendo el protocolo de la figura 13 es de 1.6 mutaciones. En la tabla 12 se indican las mutaciones patogénicas encontradas en todas las muestras analizadas, y en las figuras 15 y 16 los árboles y audiometrías de las familias diagnosticadas respectivamente. La figura 17 representa el porcentaje de prevalencia encontrado de cada uno de los genes en población española.

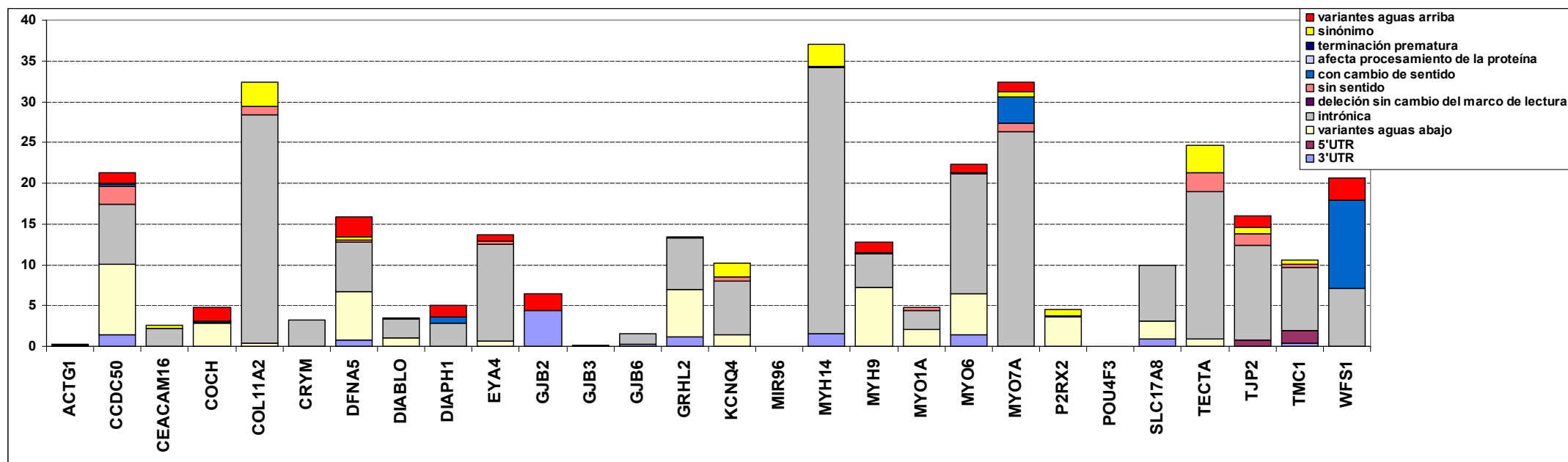


Figura 14: Número medio de cambios obtenidos en cada uno de los genes incluidos en el diseño de captura OTO-NGS-Panel, indicando el tipo de cambio. Este diseño captura regiones exónicas, y solamente 25 pb de la zona intrónica que rodea cada uno de los exones capturados. A pesar de ello, el 63% de los cambios detectados en estos genes se encuentran en regiones intrónicas.

| Muestra | Gen | Mutación | Cambio proteico | Referencia | SIFT | Polyphen |
|---------|----------------|----------------|------------------|--|------|----------|
| AD4 | <i>EYA4</i> | c.781delA | p.Thr261Argfs*34 | - | - | - |
| AD5 | <i>TECTA</i> | c.569C>T | p.Thr190Met | - | 0 | 1 |
| AD6 | <i>MYO6</i> | c.3280+2T>C | - | - | - | - |
| AD8 | <i>COL11A2</i> | c.962C>T | p.Ala321Val | - | 0.2 | 0.997 |
| AD12 | <i>MYH14</i> | c.359C>T | p.Ser120Leu | Yang T. 2005 | 0 | 1 |
| AD13 | <i>MYO6</i> | c.1136T>A | p.Leu379Gln | - | 0.01 | 1 |
| AD15 | <i>TECTA</i> | c.5668C>T | p.Arg1890Cys | Platinga RF. 2006 Hildebrand MS. 2011 | 0 | 1 |
| AD16 | <i>TECTA</i> | c.3283C>T | p.Arg1095Cys | - | 0.05 | 1 |
| AD17 | <i>TECTA</i> | c.5509T>G | p.Cys1837Gly | Moreno-Pelayo MA. 2001 | 0 | 0.999 |
| AD23 | <i>POU4F3</i> | c.752G>A | p.Trp251* | - | - | - |
| AD24 | <i>TECTA</i> | c.5668C>T | p.Arg1890Cys | Hildebrand MS. 2011 | 0 | 1 |
| AD25 | <i>TECTA</i> | c.4549T>C | p.Cys1517Arg | Hildebrand MS. 2011 | 0.02 | 1 |
| AD30 | <i>POU4F3</i> | c.578G>C | p.Arg193Pro | - | 0 | 1 |
| AD31 | <i>MYO6</i> | c.3610C>T | p.Arg1204Trp | Oonk AM 2013 | 0 | 1 |
| AD32 | <i>POU4F3</i> | c.704_705del | p.Ser237Alafs*65 | - | - | - |
| AD33 | <i>EYA4</i> | c.1078C>A | p.Pro360Thr | - | 0.09 | 0.965 |
| AD34 | <i>TECTA</i> | c.5509T>G | p.Cys1837Gly | Moreno-Pelayo MA. 2001 | 0 | 0.999 |
| AD35 | <i>TECTA</i> | c.5597C>T | p.Thr1866Met | Sagong B. 2010 | 0 | 1 |
| AD36 | <i>WFS1</i> | c.2108G>A | p.Arg703His | Sun Y, 2011 | 0.16 | 1 |
| AD38 | <i>MYO7A</i> | c.2763_2765del | p.Lys923del | - | - | - |
| AD42 | <i>MYO6</i> | c.826C>T | p.Arg276* | - | - | - |
| AD43 | <i>KCNQ4</i> | c.626T>G | p.Leu209Arg | - | 0 | 1 |
| AD46 | <i>MYO6</i> | c.2545C>T | p.Arg849* | Sanggaard KM, 2008 | - | - |
| AD47 | <i>MYO6</i> | c.3610C>T | p.Arg1204Trp | Oonk AM 2013 | 0 | 1 |
| AD51 | <i>MYO6</i> | c.2508-1G<A | - | - | - | - |
| AD55 | <i>P2RX2</i> | c.1057G>A | p.Gly353Arg | Faletra F. 2014 | 0 | 1 |

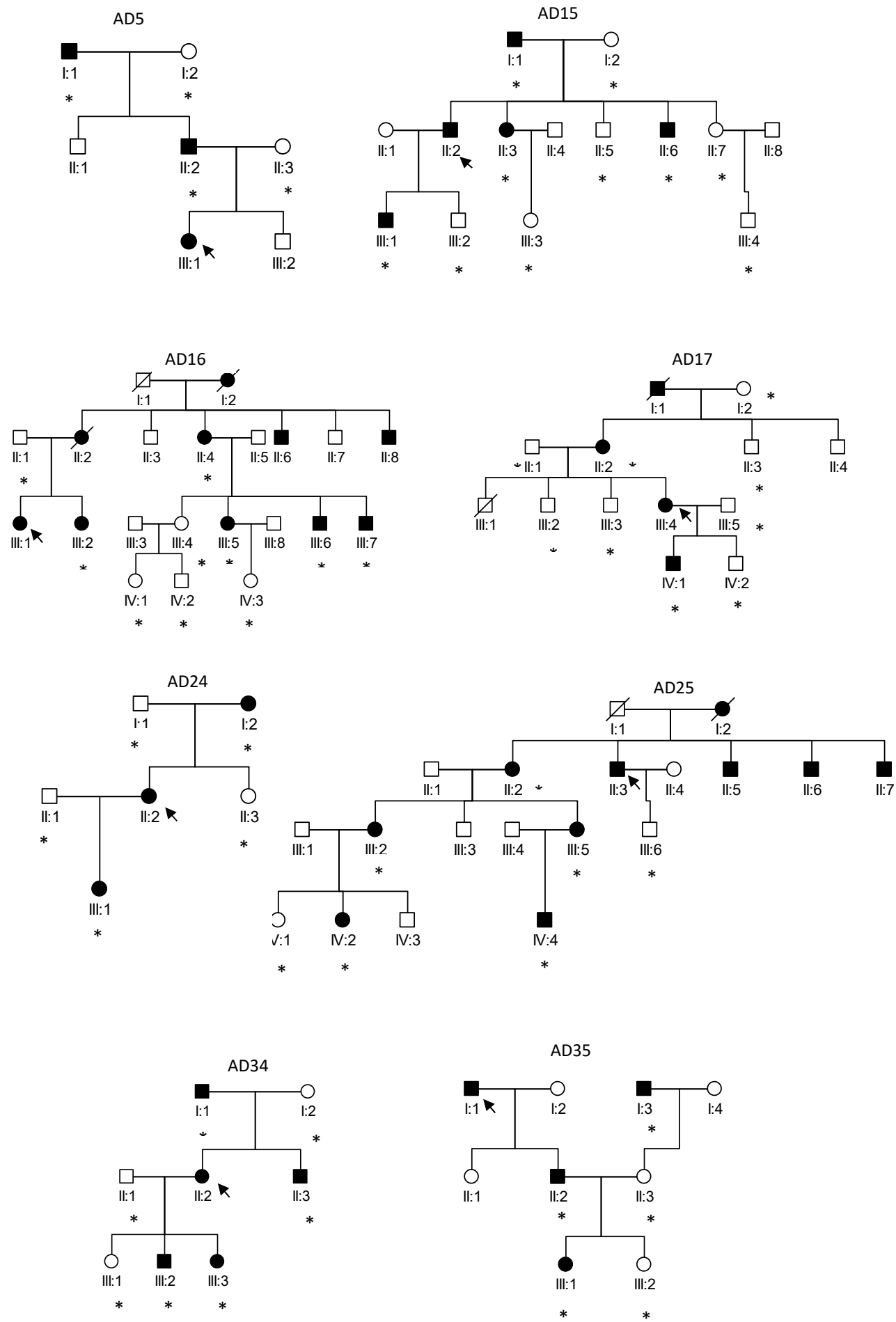
| Muestra | Gen | Mutación | Cambio proteico | Referencia | SIFT | Polyphen |
|---------|-----------------|----------------|------------------|------------------------|------|----------|
| AD56 | <i>TECTA</i> | c.5509T>G | p.Cys1837Gly | Moreno-Pelayo MA. 2001 | 0 | 0.999 |
| AD60 | <i>MYO7A</i> | c.3955G>A | p.Val1319Ile | - | 0.16 | 0.999 |
| AD65 | <i>CCDC50</i> | c.1356_1386del | p.Asp452Glufs*40 | - | - | - |
| | <i>P2RX2</i> | c.116G>A | p.Arg39Gln | - | 0.1 | 0.999 |
| AD67 | <i>DFNA5</i> | c.1270_1273del | p.Ser424Metfs*12 | - | - | - |
| AD69 | <i>MYO6</i> | c.157G>A | p.Glu53Lys | - | 0.13 | 0.405 |
| AD72 | <i>POU4F3</i> | c.672C>A | p.Ser224Arg | - | 0 | 1 |
| AD73 | <i>KCNQ4</i> | c.826T>G | p.Trp276Gly | - | 0 | 1 |
| | <i>WFS1</i> | c.2398A>G | p.Lys800Glu | - | 0.09 | 0.958 |
| AD92 | <i>DIAPH1</i> | c.692T>C | p.Ile231Thr | - | 0 | 0.998 |
| AD94 | <i>KCNQ4</i> | c.857A>G | p.Tyr286Cys | - | 0 | 1 |
| AD96 | <i>TECTA</i> | c.4391G>T | p.Cys1464Phe | - | 0 | 1 |
| AD102 | <i>DFNA5</i> | c.1270_1273del | p.Ser424Metfs*12 | - | - | - |
| AD104 | <i>DFNA5</i> | c.991-2A>G | - | Chai Y. 2014 | - | - |
| AD105 | <i>WFS1</i> | c.2108G>A | p.Arg703His | Sun Y, 2011 | 0.16 | 1 |
| AD107 | <i>TJP2</i> | c.46A>G | p.Lys16Glu | - | 0.01 | 0.675 |
| AD109 | <i>TECTA</i> | c.4549T>C | p.Cys1517Arg | Hildebrand MS. 2011 | 0.02 | 1 |
| AD110 | <i>MYH14</i> | c.181-195del | p.Leu62-Glu66del | - | - | - |
| AD111 | <i>MYO6</i> | c.466G>T | p.Gly156Cys | - | 0 | 1 |
| AD114 | <i>CEACAM16</i> | c.508G>A | p.Ala170Thr | - | 0.16 | 0.122 |
| AD115 | <i>EYA4</i> | c.160G>T | p.Glu54* | - | - | - |
| | <i>MYO7A</i> | c.2057G>A | p.Arg686His | - | 0.01 | 1 |
| AD116 | <i>TECTA</i> | c.4994G>A | p.Cys1665Tyr | - | 0.37 | 0.999 |
| AD121 | <i>MYO7A</i> | c.3763del | p.Lys1255Argfs*8 | - | - | - |
| AD123 | <i>POU4F3</i> | c.720C>A | p.Asn240Lys | - | 0 | 1 |

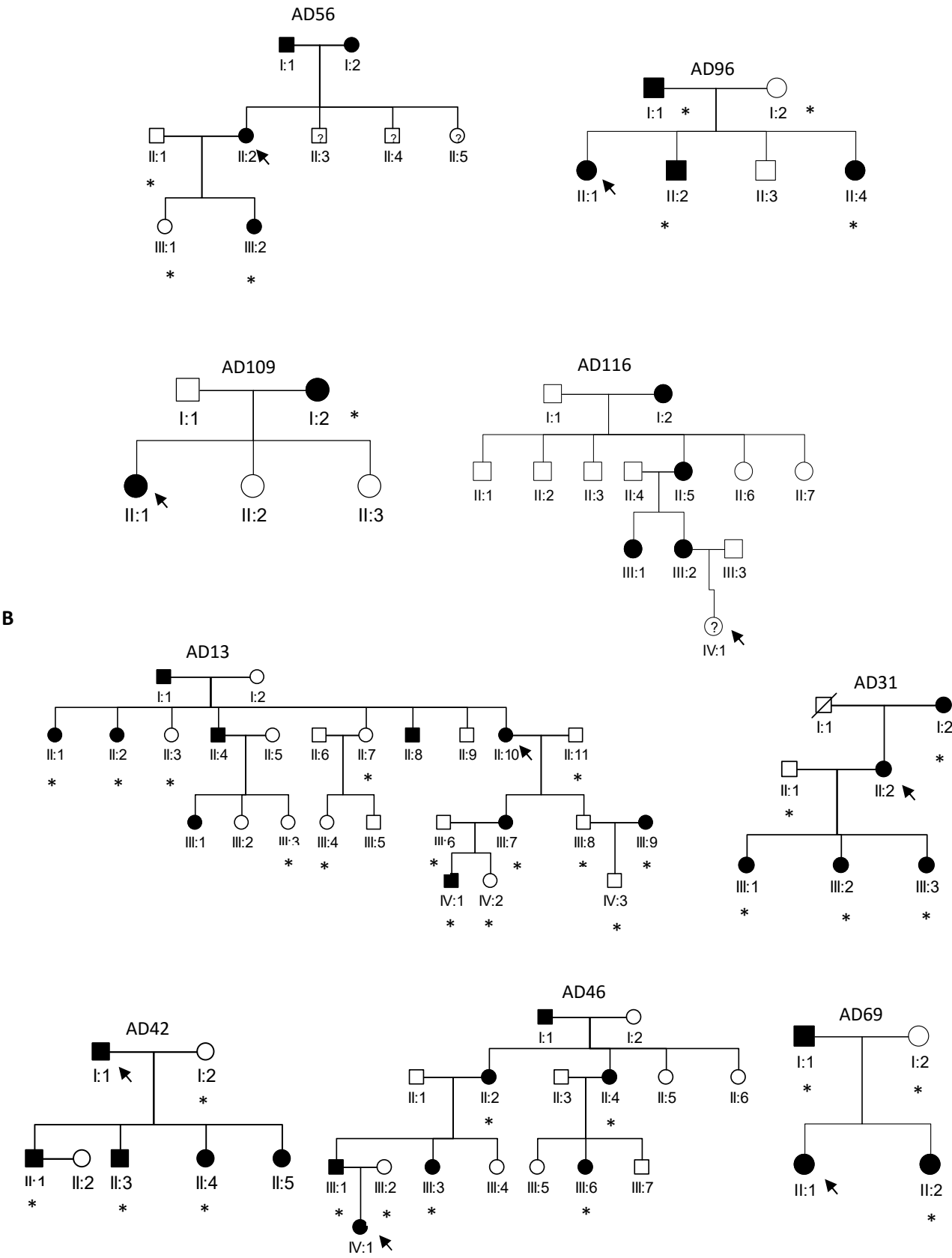
Tabla 12: Mutaciones patogénicas encontradas en las muestras analizadas por OTO-NGS-Panel.

En cada caso se indica el gen, la mutación encontrada y el cambio proteico que genera, así como

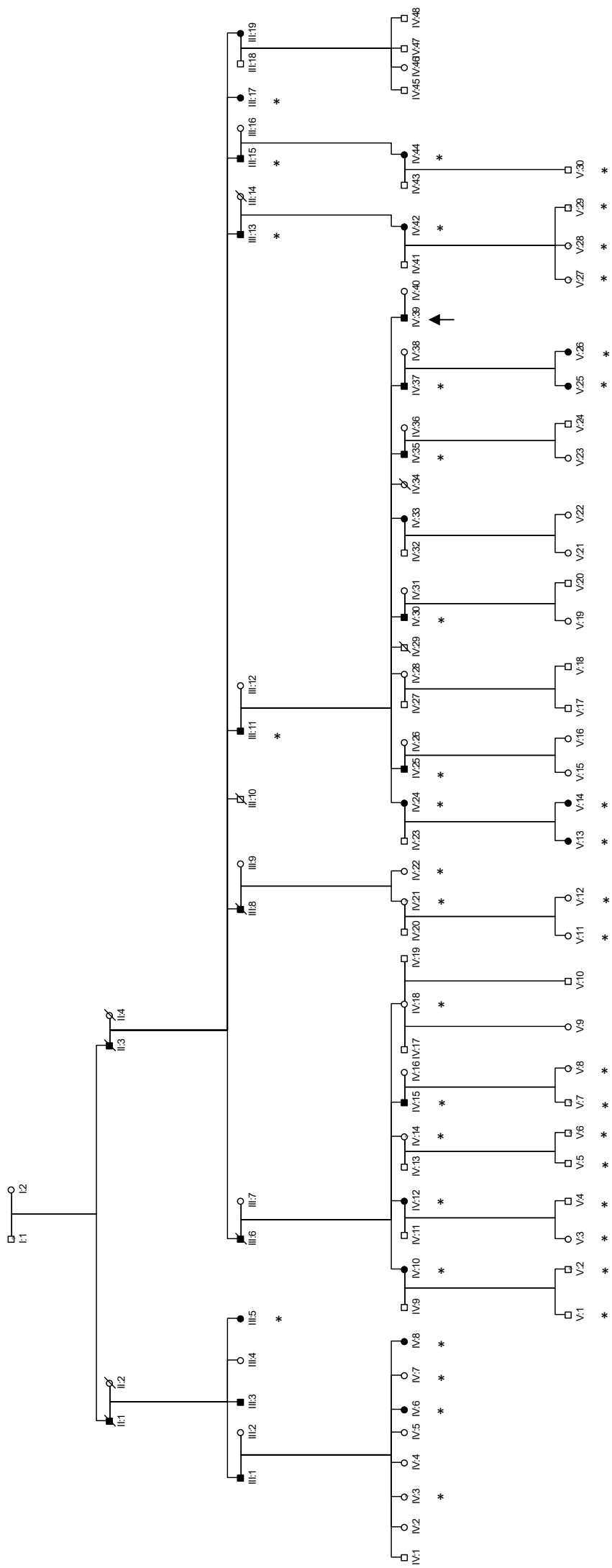
la referencia bibliográfica (si existe) en la que fue descrita por primera vez, y los valores obtenidos en los predictores de patogenicidad SIFT y Polyphen. Todas las mutaciones han sido confirmadas por segregación en la familia cuando ha sido posible. *CCDC50* (NM_178335), *CEACAM16* (NM_001039213), *COL11A2* (NM_080681), *DFNA5* (NM_001127453), *DIAPH1*(NM_005219), *EYA4* (NM_004100), *KCNQ4* (NM_004700), *MYO6* (NM_004999), *MYO7A* (NM_001127180), *MYH14* (NM_024729), *POU4F3* (NM_002700), *P2RX2* (NM_174873), *TECTA* (NM_005422), *TJP2* (NM_001170416), *WFS1* (NM_006005).

A

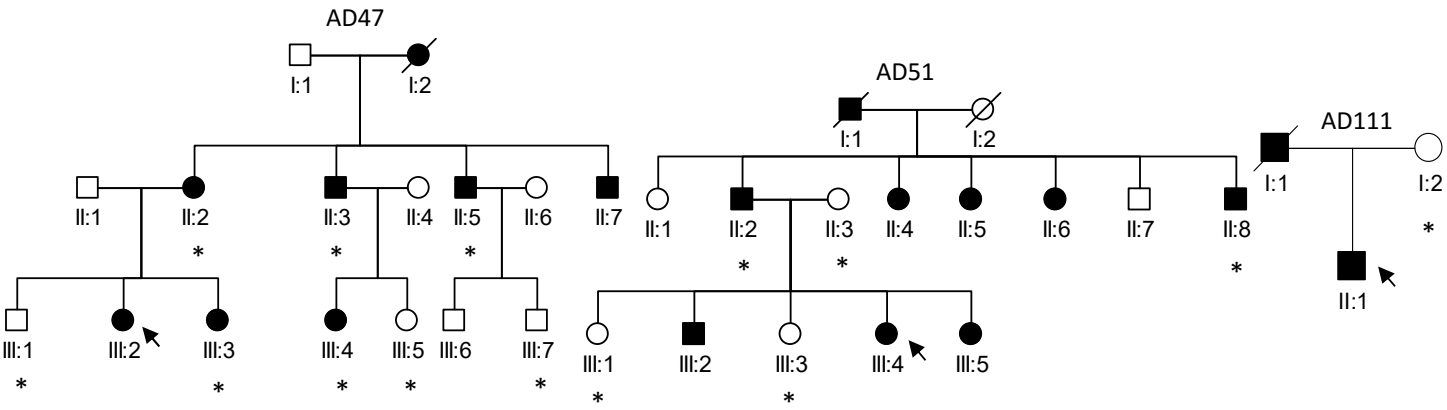




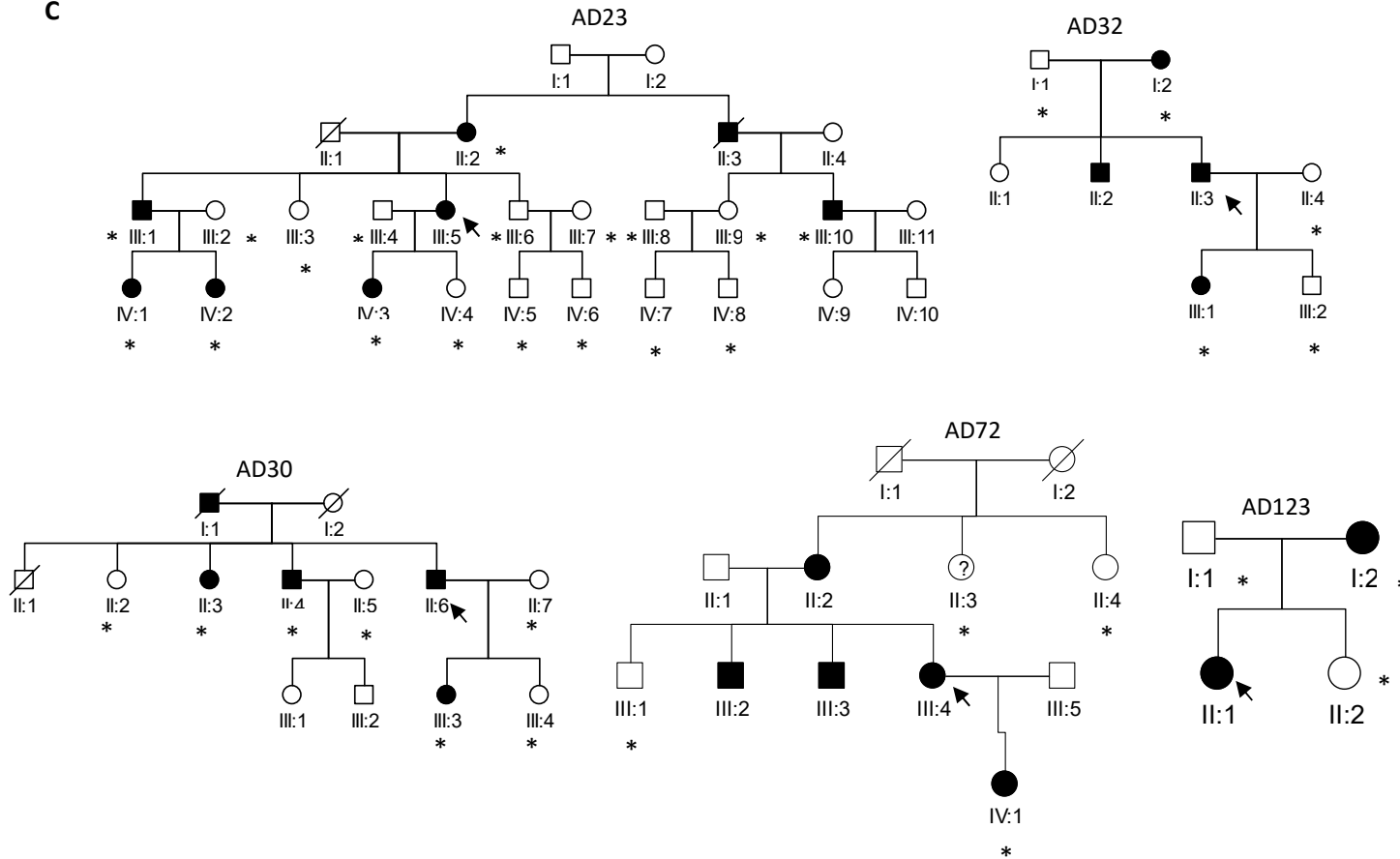
AD6



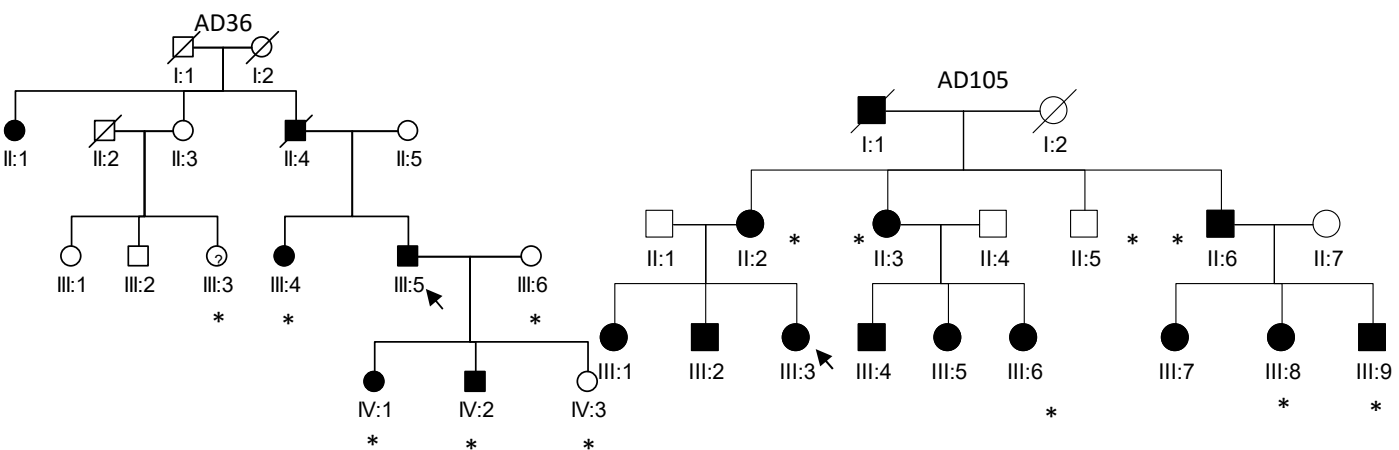
Resultados



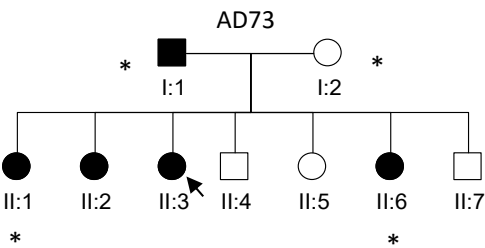
C



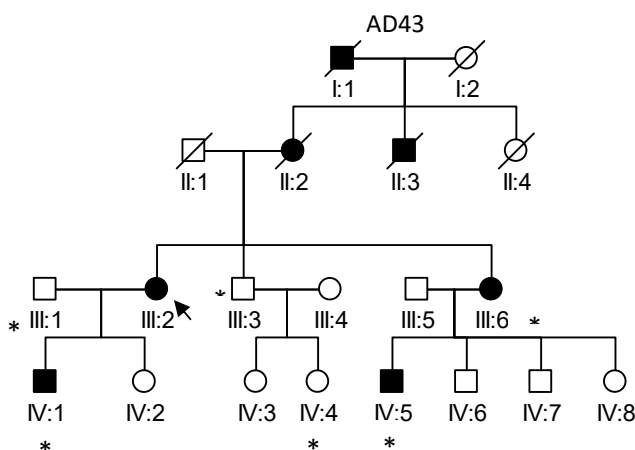
D



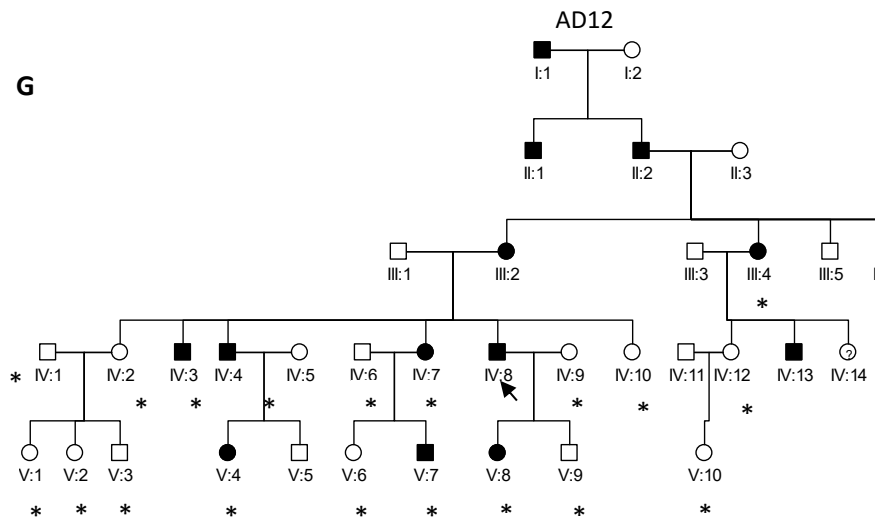
E



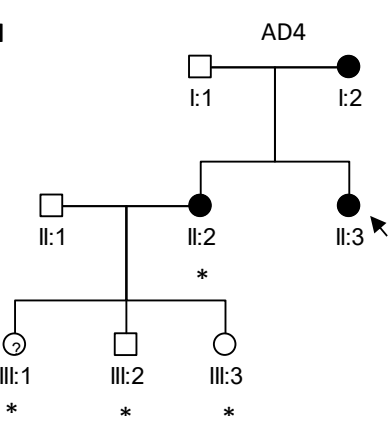
F



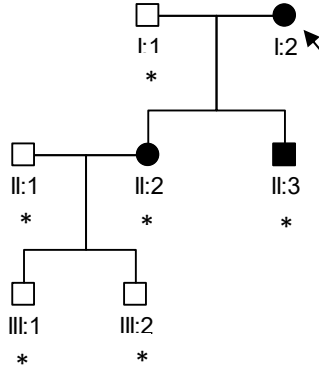
G



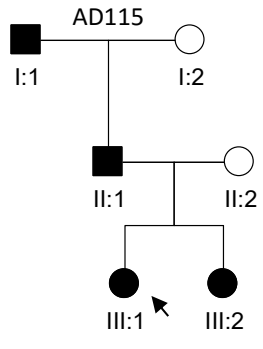
H



AD33



I



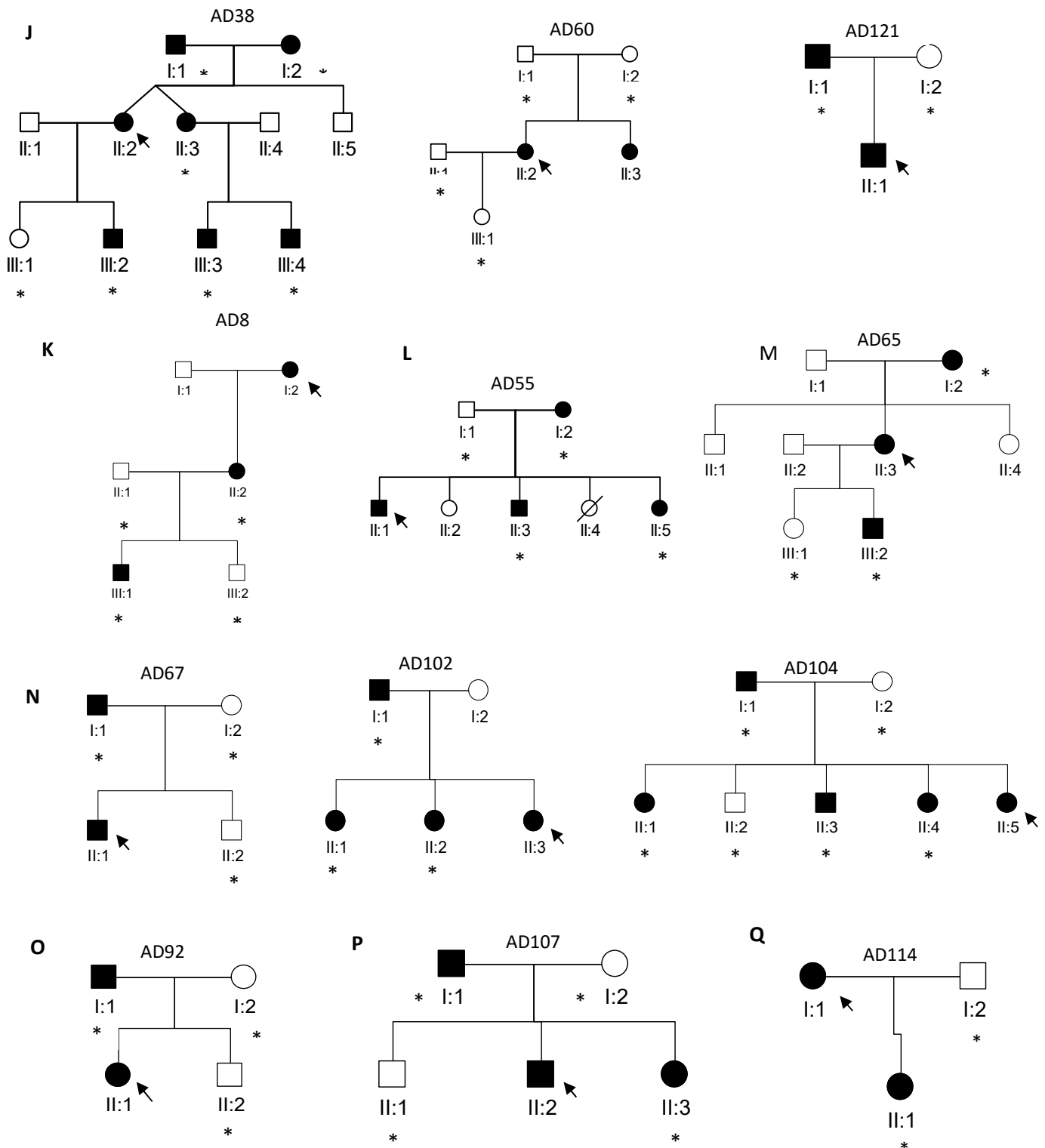
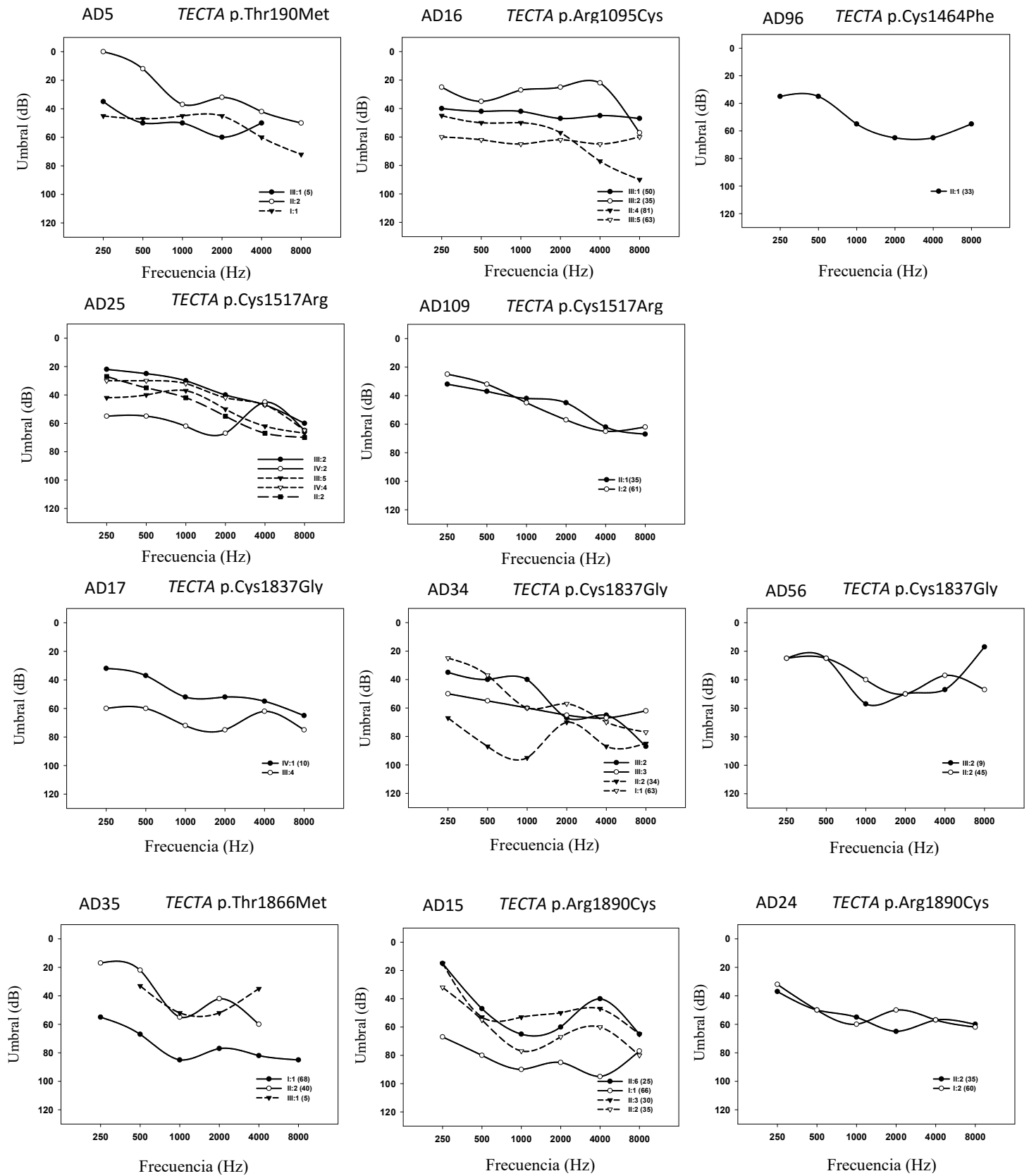
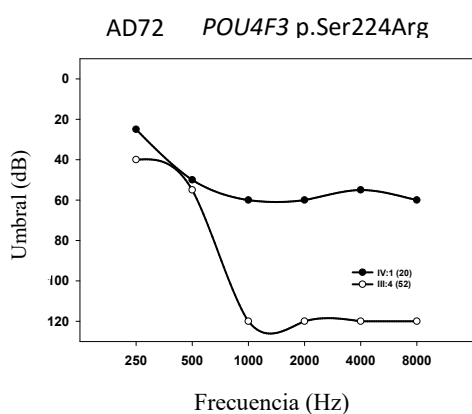
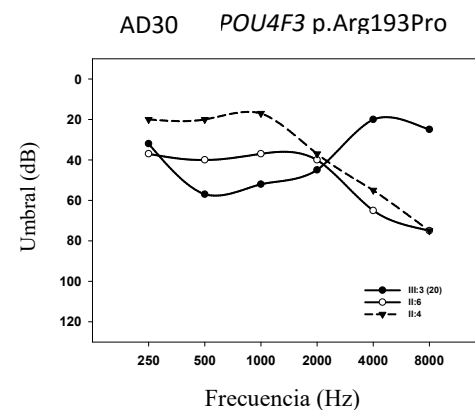
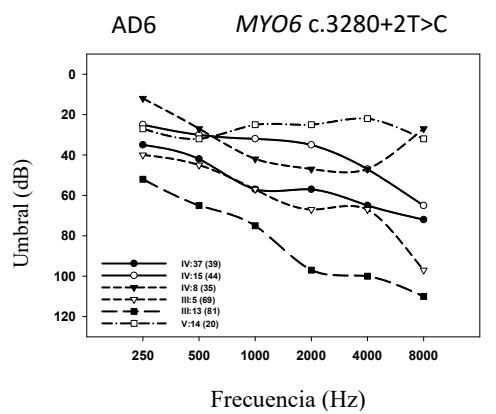
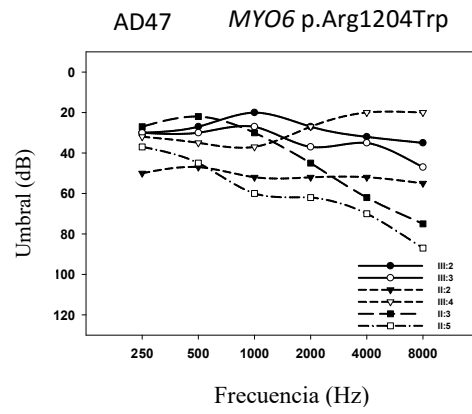
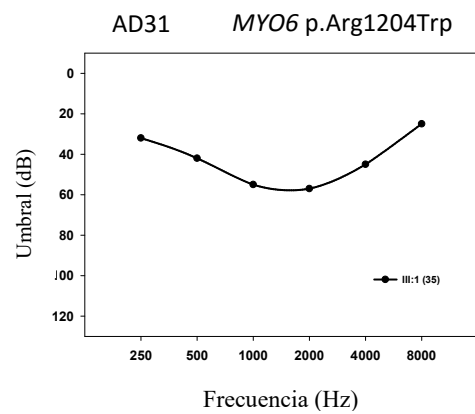
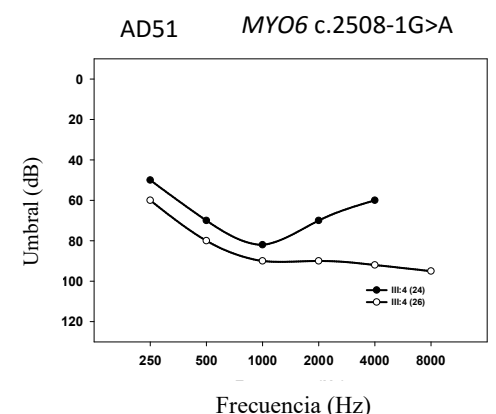
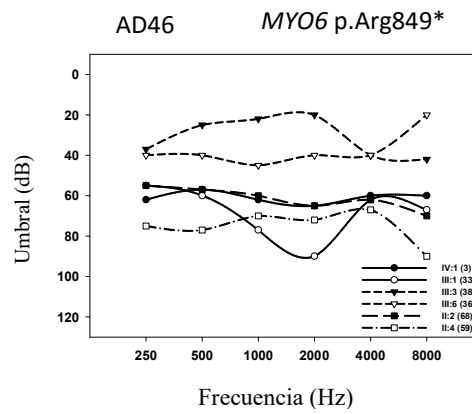
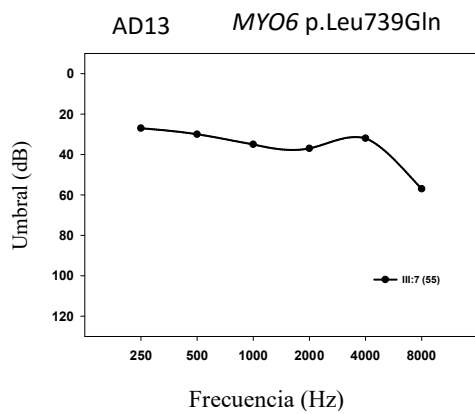
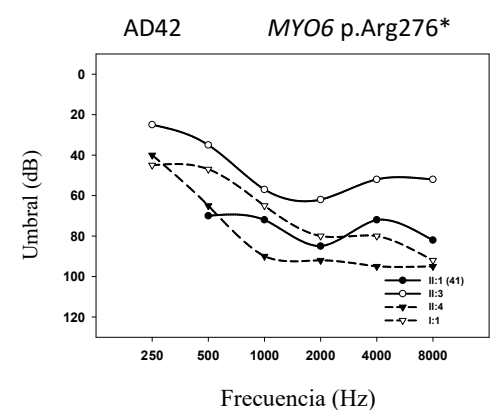
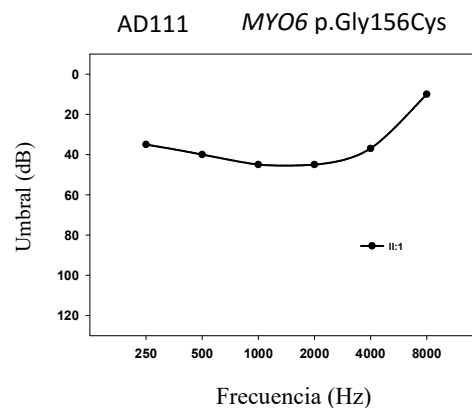
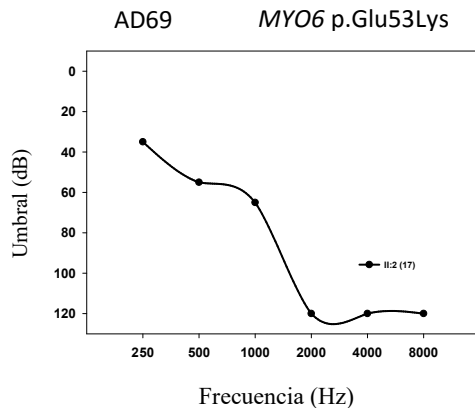


Figura 15. Árboles genealógicos de las familias diagnosticadas utilizando OTO-NGS-Panel con mutaciones en el gen: A: *TECTA*. B: *MYO6*. C: *POU4F3*. D: *WFS1*. E: *KCNQ4/WFS1*. F: *KCNQ4*. G: *MYH14*. H: *EYA4*. I: *EYA4/MYO7A*. J: *MYO7A*. K: *COL11A2*. L: *P2RX2*. M: *CCDC50/P2RX2*. N: *DFNA5*. O: *DIAPH1*. P: *TJP2*. Q: *CEACAM16*. El individuo analizado por secuenciación masiva mediante OTO-NGS-Panel está marcado con una fecha y los parientes analizados por secuenciación Sanger para confirmar segregación con un asterisco.

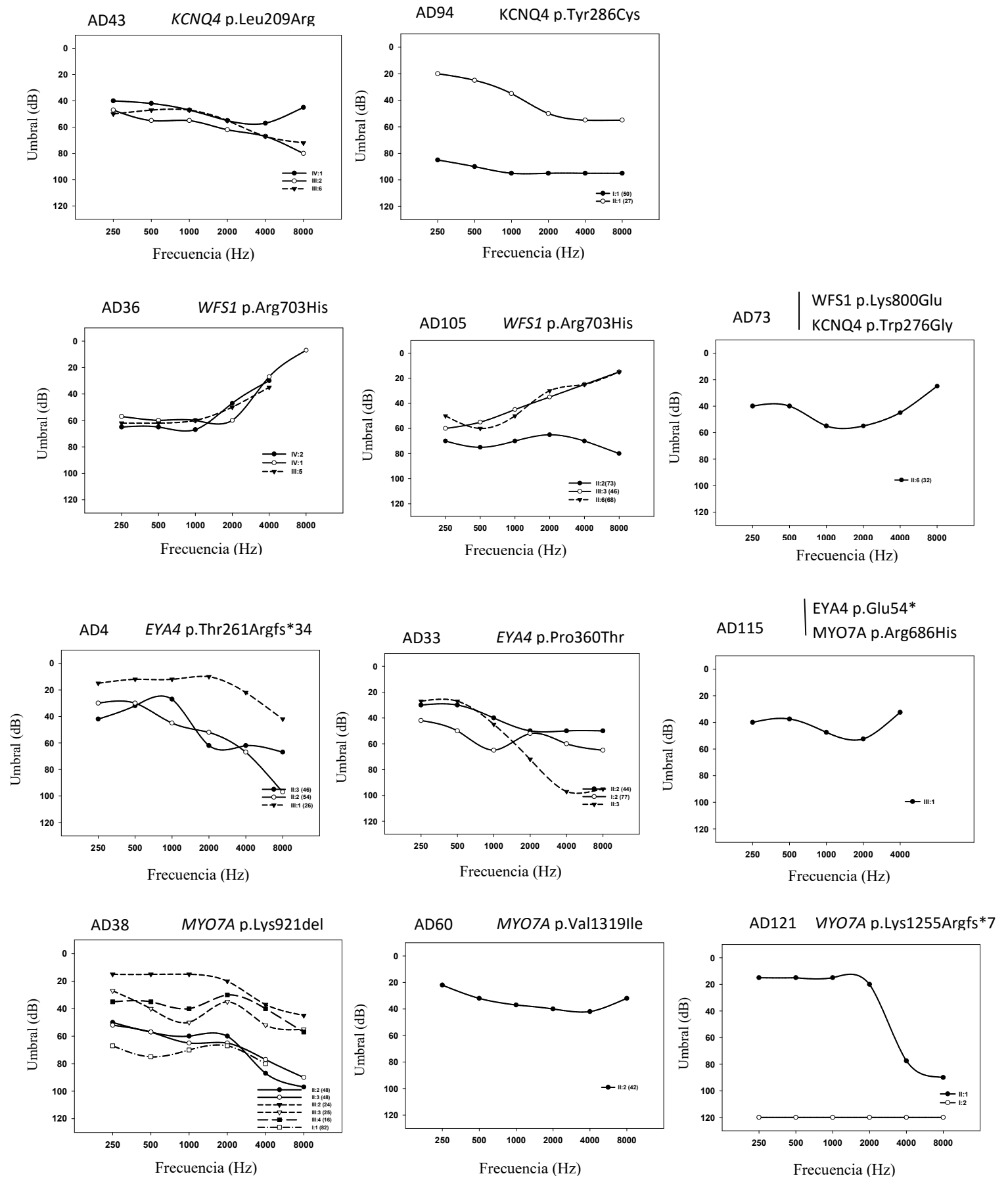
Resultados



Resultados



Resultados



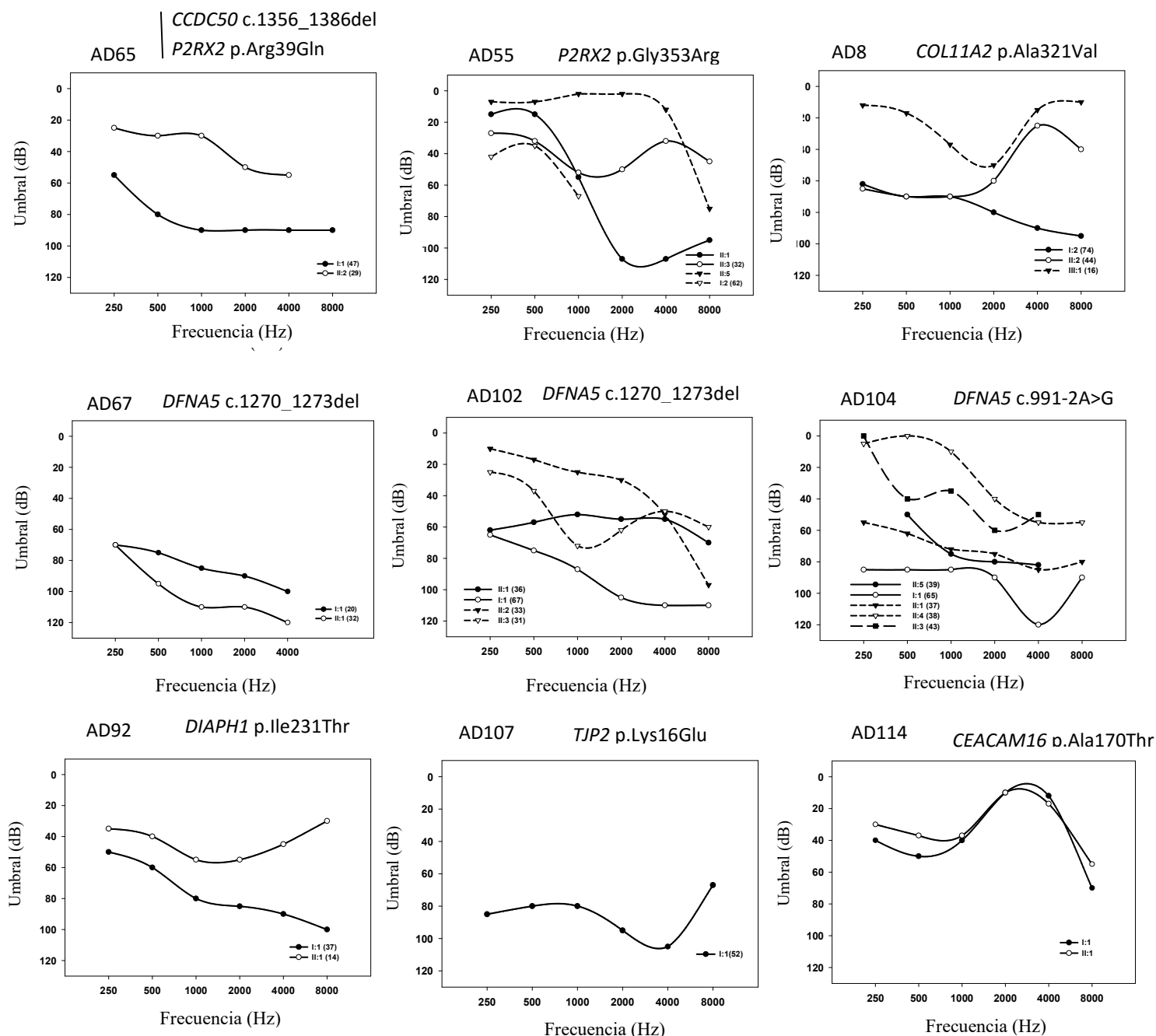


Figura 16: Perfiles audiométricos de las familias diagnosticadas mediante secuenciación masiva utilizando OTO-NGS-Panel.

Se ha encontrado la mutación patogénica en el 44% de las muestras analizadas mediante el OTO-NGS-Panel. Los genes causantes de hipoacusia más prevalentes en población española son *TECTA*, que representa el 11%, *MYO6*, que representa el 8% y *POU4F3* que representa el 5%. Todas las variantes obtenidas de la secuenciación masiva están siendo incluidas en una base de datos protegida por una licencia de explotación comercial con el fin de facilitar el análisis de nuevas muestras españolas de hipoacusia no sindrómica.

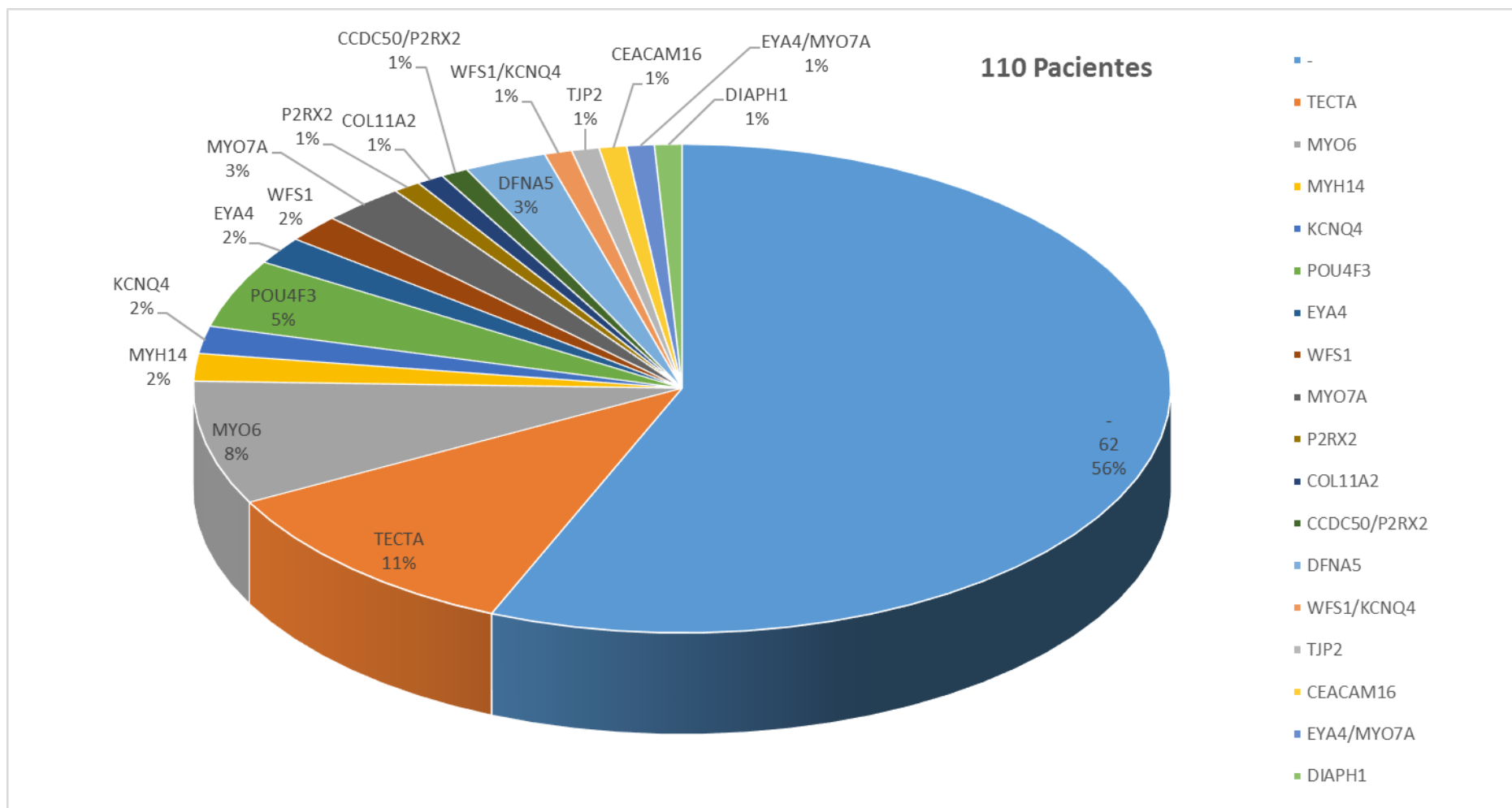


Figura 17: Gráfico con el porcentaje de las mutaciones encontradas por gen descrito. Todas estas variantes segregaban con la hipoacusia en la familia y no estaban presentes en las bases de datos: proyecto 1000 genomas, 6500 exomas (Exome Sequencing Project) ni 404 Spanish Exome Server (CIBERER).

5. Estudio del gen asociado a la hipoacusia subtipo DFNA49 mediante aCGH y NGS

DFNA49 es un subtipo de hipoacusia en el que el gen asociado no ha sido identificado aún. Este subtipo de hipoacusia fue descrito en trabajos previos del laboratorio (Moreno-Pelayo et al 2003) (Fig 18).

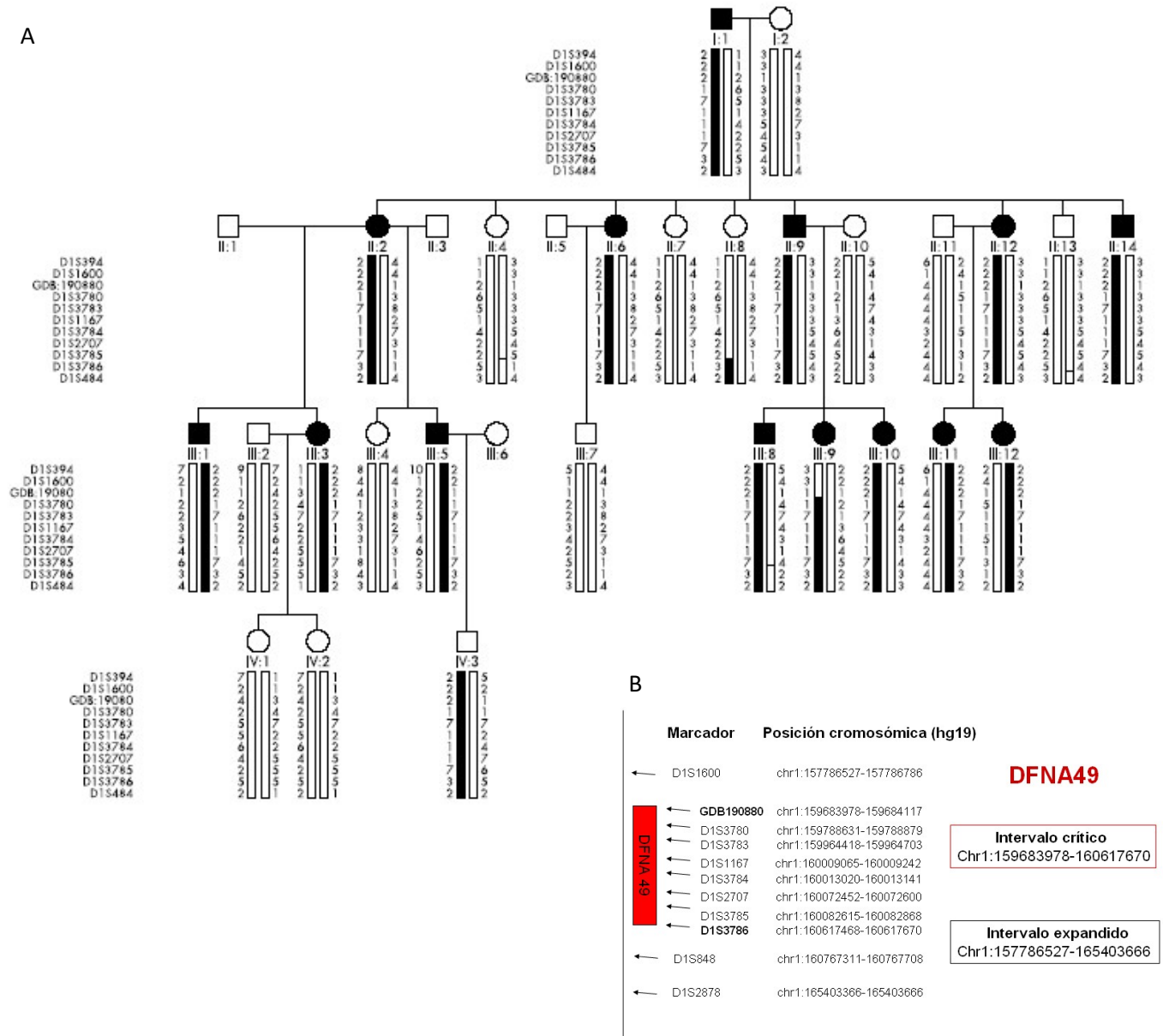


Figura 18: (A) Árbol genealógico y haplotipo de la familia española en la que DFNA49 fue descrito. Los símbolos en negrita reflejan individuos afectados. Los haplotipos son representados mediante barras, y las barras en negrita son asociadas a la hipoacusia. Los individuos II:8 y III:9 fueron los individuos que permitieron acotar el intervalo crítico (B).

Elegimos 3 individuos afectados de la familia (III:3, III:11, III:12) para llevar a cabo una secuenciación a exoma completo. Se hizo un filtrado de las variantes obtenidas, analizando con mayor interés los cambios que se encontraban dentro del intervalo crítico; pero no se obtuvo ningún cambio nucleotídico causante de la hipoacusia en el intervalo en estudio.

Posteriormente, se llevó a cabo el diseño de un array CGH dirigido al análisis del intervalo crítico del DFNA49 para analizar si la causa genética era una variación patogénica en el número de copia de los pacientes (Fig.19). Se analizaron 8 individuos de la familia, 7 afectados y uno sano, con el objetivo de encontrar CNVs que afectaran a las pacientes pero que no se encontraran en el individuo sano. Se identificaron varias CNVs, las cuales no eran compartidas por todos los individuos afectados.

A



B

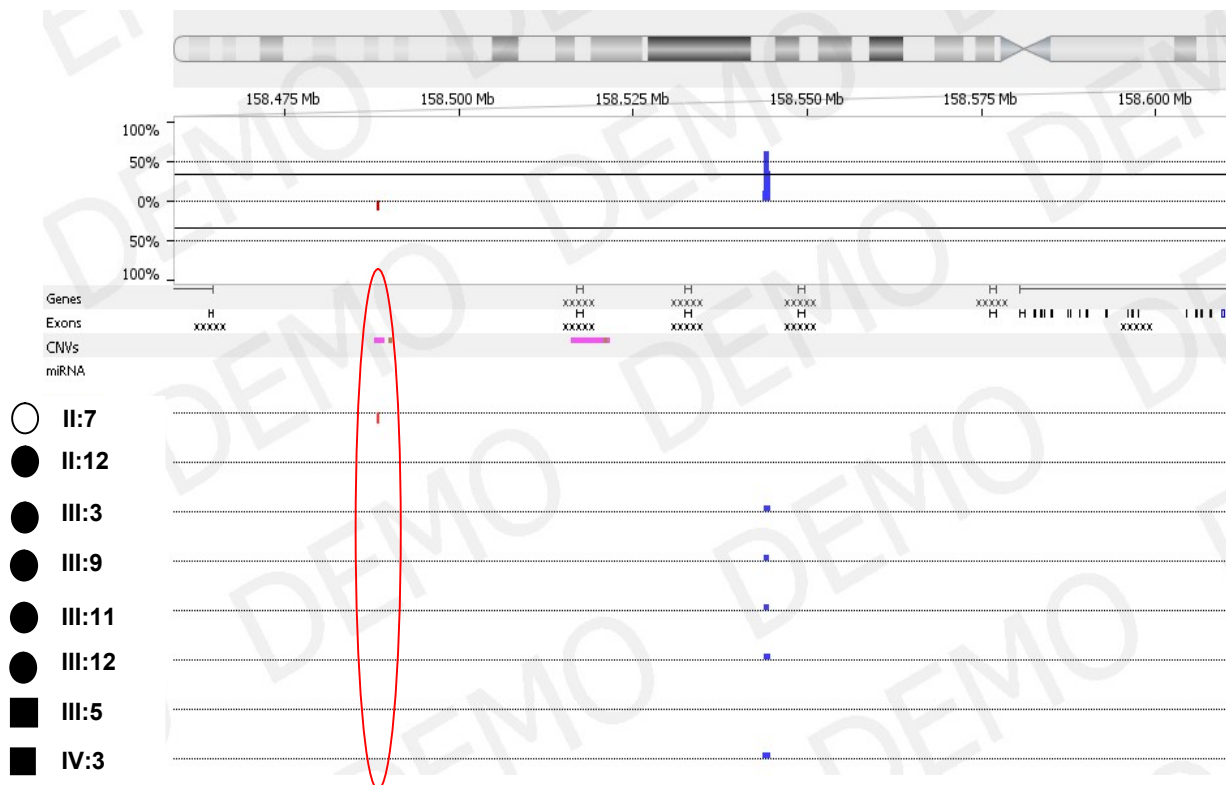


Figura 19: Resultados del aCGH diseñado (12x135K: tecnología Nimblegen) cubriendo las regiones del intervalo ampliado del DFNA49. Dentro de la región DFNA49 no se encontraron cambios en número de copia que coincidieran en todos los pacientes afectados, y que no estuvieran presentes en los individuos control. Se detectó una duplicación (A) y una delección (B) en el individuo sano que no se encontraban en los pacientes.

B) HIPOACUSIA SINDRÓMICA

6. Estudio genético de 14 familias españolas con Síndrome de Stickler

Hemos analizado un total de 14 familias españolas con al menos un individuo con signos clínicos característicos del Síndrome de Stickler. Se ha estudiado por secuenciación Sanger el gen *COL2A1*, causante del síndrome de Stickler tipo 1, que afecta al 60% de los pacientes; y el gen *COL9A1*, primer gen publicado causante de Stickler recesivo. De las 14 familias analizadas, hemos encontrado la mutación causante de su enfermedad en el 50% de ellas. Seis de las familias poseen mutaciones patogénicas en el gen *COL2A1*, y la última familia representa el primer caso de Stickler recesivo español con una mutación en el gen *COL9A1*.

Tres de las mutaciones patogénicas encontradas en el gen *COL2A1* son mutaciones que afectan a los sitios consenso de procesamiento del ARN mensajero. La mutación c.430-1G>A (Hoornaert KP. 2010) encontrada en la familia SS39 afecta al procesamiento del exón 7, la mutación c.1941+2T>C encontrada en la familia SS54 afecta al procesamiento del exón 29, y la mutación c.871-2A>C encontrada en la familia SS60 afecta al procesamiento del exón 14. Estas dos últimas mutaciones no habían sido descritas con anterioridad, ni estaban presentes en las bases de datos (1000 genomas, 6500 exomas, 404 Exomas españoles). Su patogenicidad fue evaluada analizando su presencia en 90 controles españoles sanos.

La familia SS39 esta formada por tres individuos, dos de ellos afectados por el síndrome de Stickler (figura 20A). El individuo II:1 era una mujer de 26 años con malformaciones faciales, problemas oculares y esqueléticos. La madre de este individuo (I:2) presentaba un mayor número de signos clínicos oculares y menor número de signos esqueléticos. Ninguna de las dos presenta hipoacusia (tabla 13). La mutación encontrada en esta familia afecta al sitio aceptor de splicing del exón 7: c.430-1G>A (Hoornaert KP. 2010). El análisis de la secuencia de cADN de uno de los pacientes mostró que se utilizaba un sitio aceptor críptico situado una base aguas abajo del sitio consenso, generando una proteína aberrante con una mutación de cambio de fase que sustituye los 54 aminoácidos siguientes y genera una terminación prematura (p.Gly144Valfs*54) (Fig 20A).

La familia SS54 tiene un individuo afectado por el síndrome de Stickler, con rasgos oculares, orofaciales y esqueléticos (fig 20B y tabla 13). La mutación encontrada en el gen *COL2A1* afecta al sitio donador de splicing del exón 29: c.1941+2T>C. El análisis in silico de esta mutación predijo que generaba el procesamiento alternativo del exón 29 utilizando un sitio donador crítico de splicing situado 4 bases aguas abajo, resultando en la terminación prematura de la proteína (p.Gly648Alafs*6); o producir la eliminación de dicho exón, lo que de igual modo generaría una proteína aberrante.

La familia SS60 es una familia de tres individuos, dos de ellos afectados por el síndrome de Stickler con signos oculares, orofaciales y esqueléticos (figura 20C y tabla 13). La mutación encontrada en los individuos afectados c.871-2A>C modifica el sitio aceptor de splicing del exón 14, lo que puede resultar en la eliminación de dicho exón o en el uso de un sitio crítico aceptor de splicing situado 8 bases aguas abajo (p.Gly291Alafs*14) según el predictor bioinformático NNSPLICE0.9.

El resto de las familias diagnosticadas tienen cambios puntuales en la secuencia codificante de la proteína. El Síndrome de Stickler de la familia SS42 se debe a la duplicación de una citosina en el exón 7 de *COL2A1*, c.509dupC (Richards AJ. 2010), el de la familia SS61 es debido a un cambio de nucleótido en el exón 10 de *COL2A1*, c.683G>A, y el afectado de la familia SS63 presenta una delección de un nucleótido en el exón 22 del gen *COL2A1*, c.1381del. Todos estos cambios son mutaciones que aparecen de novo en los individuos afectados.

La familia SS42 es una familia de 4 individuos, pero solo uno diagnosticado como Stickler, con rasgos oculares, auditivos, orofaciales y esqueléticos (tabla 13). La secuenciación del gen *COL2A1* demostró que la mutación causante de este síndrome en el sujeto II:1 era la duplicación de una citosina, que había surgido de novo en dicho paciente, junto a un homopolímero compuesto de 6 citosinas c.509dupC en el exón 7 (figura 20D) (Richards AJ. 2010). Esta repetición producía una terminación prematura de la proteína (p.Gly171Trpfs*18). La presencia de un polimorfismo tipo SNP (rs3737548) situada una base 5' delante de la duplicación permitió determinar que la mutación se había producido en la cadena de origen paterno del paciente.

El individuo afectado de la familia SS61 llegó al laboratorio diagnosticado como posible paciente de Stickler, pero sin clínica descrita. La mutación encontrada en este paciente c.683G>A, provocaba un cambio de aminoácido a nivel de la proteína

p.Gly228Val, cambio que no había sido descrito con anterioridad y con valor polyphen 0.99 y valor sift 0. Este cambio no estaba presente en los padres del paciente, ni en 84 controles españoles, ni en la base de datos Ciberer Exome Server.

El individuo afectado de la familia SS63 presentaba todos los rasgos típicos de un paciente de Stickler, con problemas oculares, hipoacusia que afecta a las frecuencias altas, había sido intervenido por problemas orofaciales, y presentaba hiperlaxitud articular. La delección de una guanina encontrada en el exón 22 del gen *COL2A1* resulta en un cambio de aminoácido, y la ruptura de la fase de lectura, lo que genera una proteína truncada p.Ala461Leufs*167. Esta mutación no estaba presente en el resto de los individuos sanos de la familia ni en las bases de datos. En este caso, dada la elevada homocigosidad de la región en los individuos de la familia, no ha sido posible determinar si la delección de novo ha surgido en el alelo de origen materno o paterno.

La última familia (S722) diagnosticada genéticamente con síndrome de Stickler estaba formada por 5 individuos, dos de ellos hermanos y con signos oculares, auditivos y esqueléticos característicos de este síndrome (figura 21 y tabla 13). Al ser hijos de padres sanos, estudiamos el gen *COL9A1* que recientemente había sido publicado como causante de Stickler recesivo, y encontramos la mutación c.2074dup presente en homocigosis en los afectados, y en heterocigosis en el resto de individuos. Esta duplicación se había producido junto a un homopolímero de 6 guaninas, y produce una proteína truncada p.Glu692Glyfs*15. Este cambio no estaba presente en 75 controles sanos, ni en las bases de datos 1000 genomas, 6500 Exomas ni Spanex.

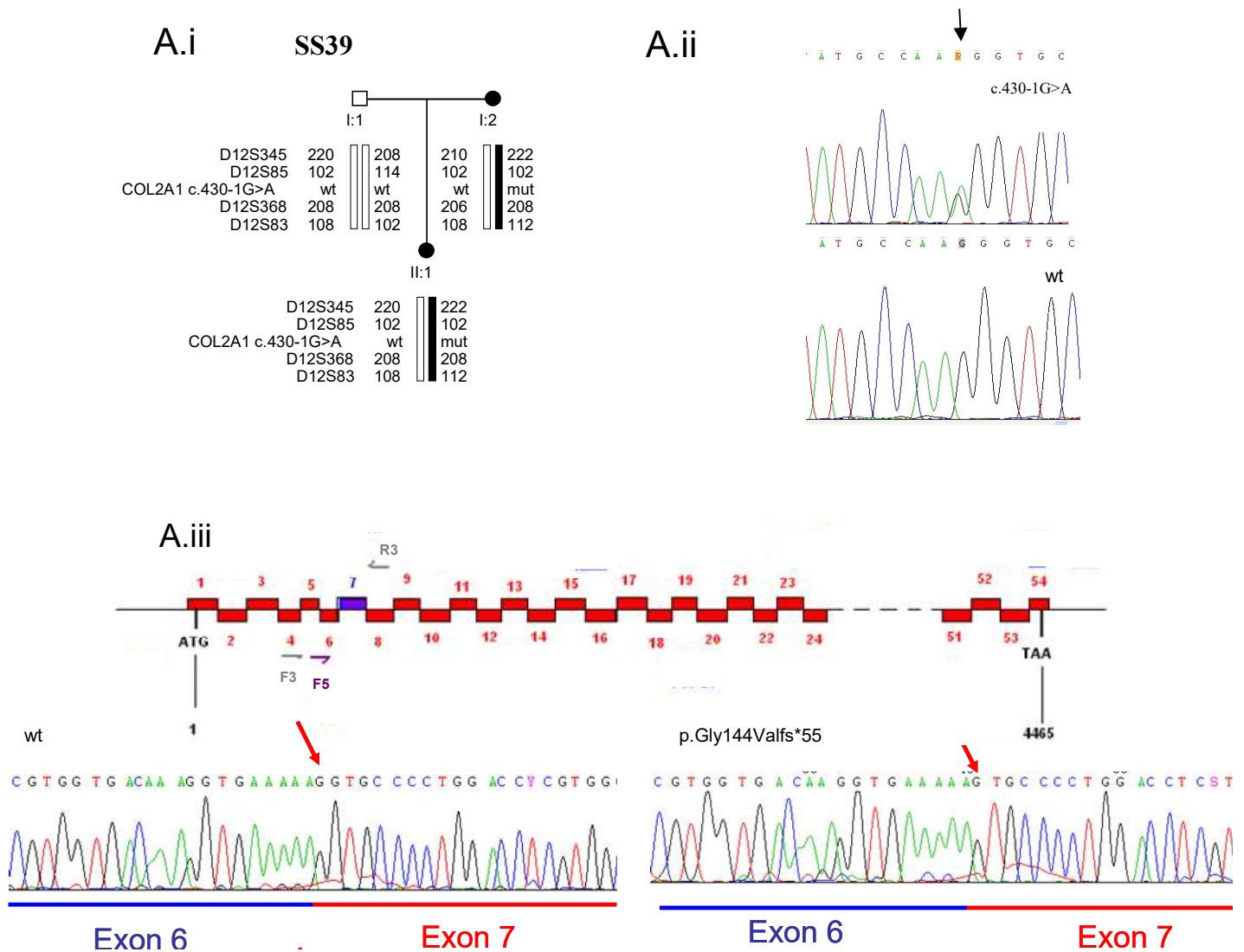
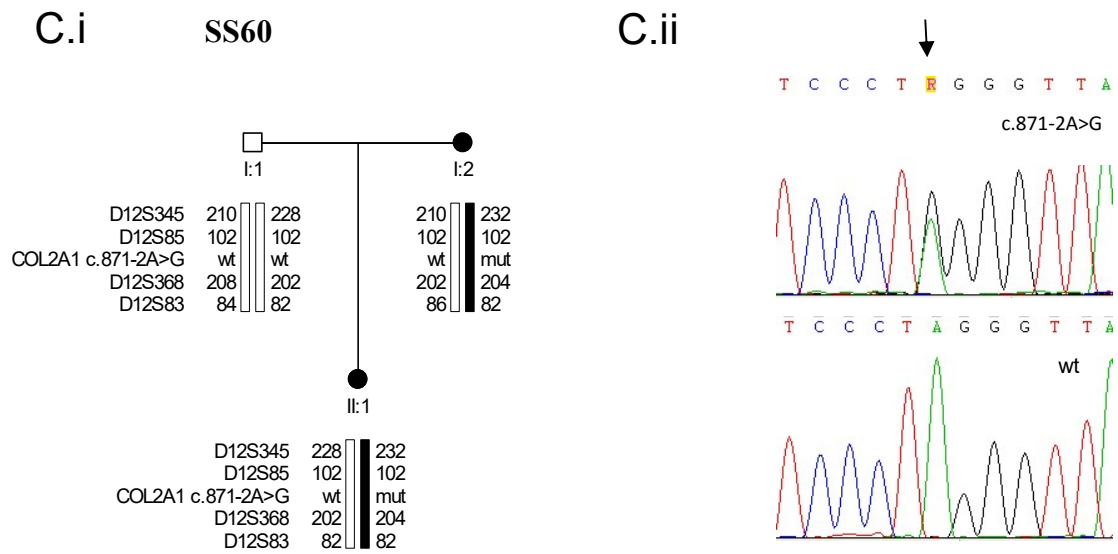
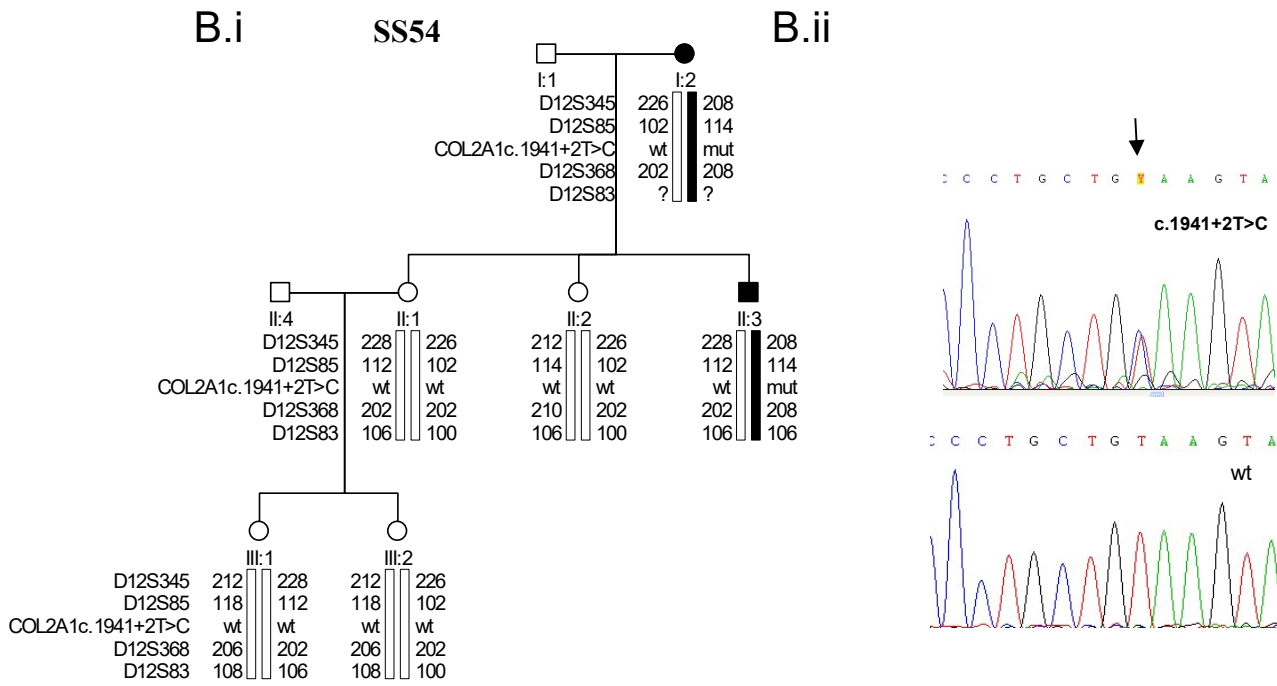
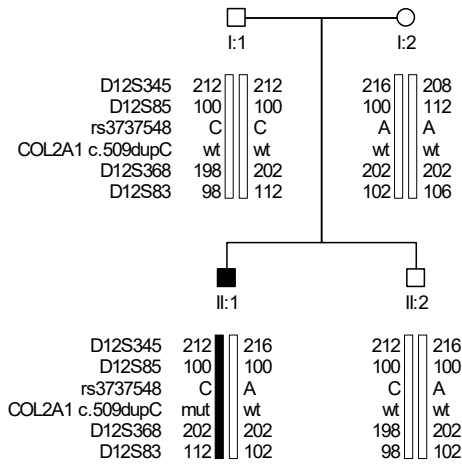


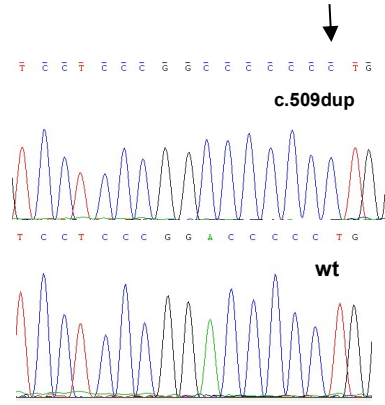
Figura 20: Árboles genealógicos de las familias del síndrome de Stickler diagnosticadas genéticamente con mutaciones en el gen *COL2A1* (NM_001844), mostrando la segregación de los haplotipos (Ai-Fi). Los electroferogramas representan las secuencias con la mutación encontrada en los individuos afectados, y las secuencias de los individuos sanos (Aii-Fii). Aiii: Gráfico indicando los cebadores utilizados para amplificar el cDNA del paciente, y secuencias silvestre y mutante obtenidas.



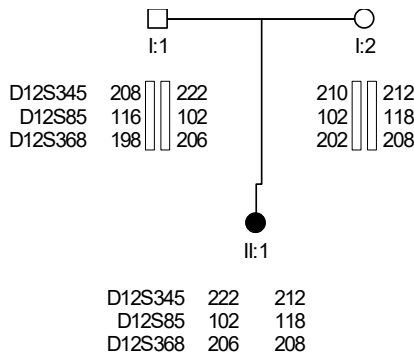
D.i SS42



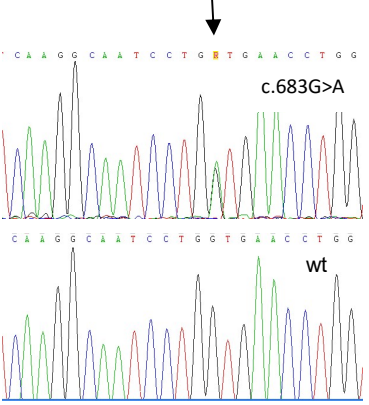
D.ii



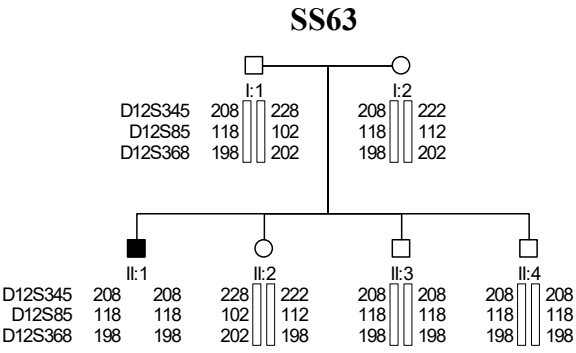
E.i SS61



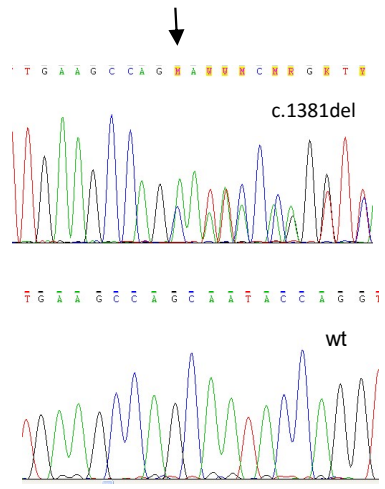
E.ii



F.i



F.ii



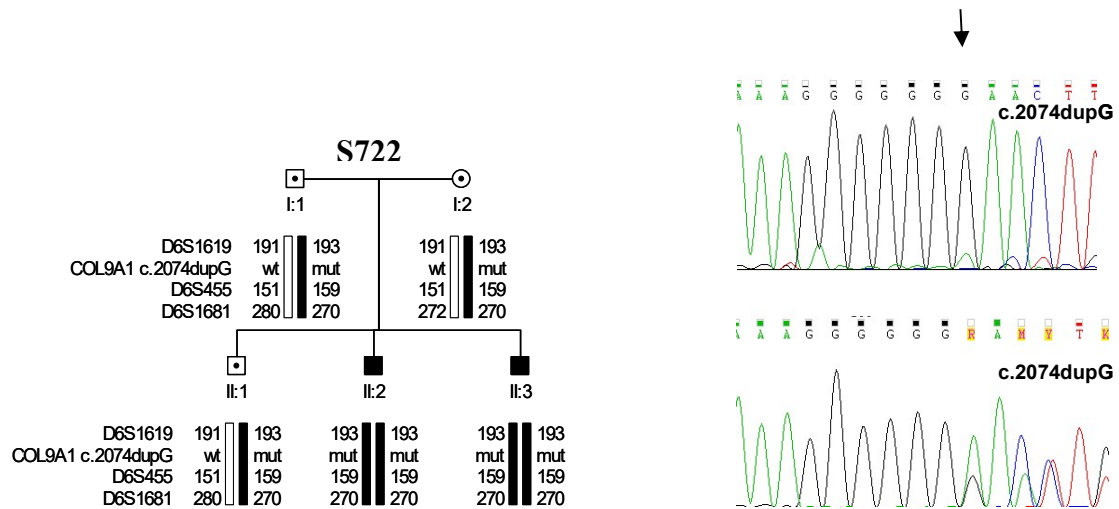


Figura 21: Árbol genealógico de la familia con afectados del síndrome de Stickler tipo 4 por tener una mutación en homocigosis en el gen *COL9A1* (NM_001851), mostrando la segregación de los haplotipos. Los electroferogramas representan las secuencias con la mutación encontrada en los individuos afectados y portadores.

Tabla 13: Manifestaciones clínicas de pacientes con el Síndrome de Stickler.

| Familia | Individuo (edad) | Síntomas oculares | Manifestaciones auditivas | Características orofaciales | Características esqueléticas |
|---------|--------------------|---|---|---|---|
| SS39 | I:2 (51) | Miopía grave Cataratas Desprendimiento de retina (ojo derecho) Astigmatismo Buitalmia Glaucoma | ND (No Determinado) | Cara plana Puente nasal ancho Hipoplasia malar Incorrecta oclusión dental Retrognatia | Coxartria secundaria 4º Metatarso corto Hipotonía |
| | II:1 (26) | Miopía grave Desprendimiento de retina Cataratas (ojo izquierdo) Astigmatismo | ND (No Determinado) | Cara plana Puente nasal ancho Hipoplasia malar Incorrecta oclusión dental Retrognatia | Braquidactilia Epifisiolisis de cabezas femorales Hernias de Schmörl Hiperlaxitud ligamentosa Metatarso corto |
| SS42 | II:1 (21) | Desprendimiento de retina (ojo izquierdo) Cataratas bilaterales Miopía grave | FA (Frecuencias Altas) Otitis frecuente | Paladar hendido Micrognatia | Engrosamiento cortical en fémur, cúbito y radio Aplastamiento de la epifisis Hiperlaxitud articular |
| SS54 | II:3 (34) | Miopía grave Desprendimiento de retina | No | Paladar hendido Micrognatia Incorrecta oclusión dental Puente nasal ancho Filtrum largo | Hiperlaxitud articular |
| SS60 | II:1 (8) | Degeneración periférica de ambos ojos | ND (No Determinado) | Retrognatia Fisura palatina | Hiperlaxitud articular |
| | I:2 (41) | Miopía | No | Fisura palatina | Hiperlaxitud articular |
| SS61 | II:1(42) | No | Si | No | Escoliosis Genu Valgo Pectus Carinatum Esclerosis interapofisaria Artrosis prematura Reducida movilidad cervical Falanges cortas Osteofitos pequeños HLA B27 positivo |
| SS63 | II:1(9) | Miopía | FA (Frecuencias Altas) | Micrognatia Faringoplastia Fisura palatina | Hiperlaxitud articular |
| S722 | II:2 (26) | Miopía | FA (Progresiva) Neurosensorial Otitis crónica | | Displasia de Smith |
| | II:3 (16) | Desprendimiento de retina (ojo derecho) | FA (Progresiva) Neurosensorial | | Escoliosis |
| | II:1 (no afectado) | Astigmatismo | | | |

7. Estudio genético de 50 pacientes propósito españoles con Síndrome de BOR

En este estudio se incluyeron 50 individuos independientes con síntomas característicos del síndrome de BOR, de los cuales 6 son casos familiares y el resto son casos esporádicos. De todos ellos, 20 fueron diagnosticados genéticamente. Sus signos clínicos están resumidos en la tabla 14, y los árboles genealógicos de las familias con más de un individuo afectado con el Síndrome de BOR se encuentran en la figura 22. Trece de estos pacientes cumplen los criterios descritos por Chang EH. et al (2004).

Tras la secuenciación del gen *EYAI* se diagnosticaron catorce pacientes (figura 23 y tabla 15). Seis de estas mutaciones eran mutaciones que truncan la proteína: tres pacientes portaban la mutación p.Arg361*, que había sido descrita previamente en un paciente español (Olavarrieta L. 2008), un paciente portaba la mutación p.Arg308* (Abdelhak S, 1997), otro paciente portaba el cambio p.Trp327* y uno más poseía la mutación p.Arg294* (Richards S, 2000). Estas mutaciones se sitúan en los exones 8, 9 y 10 del gen *EYAI*.

Cinco de los pacientes presentaban pequeñas deleciones: c.1411del (exón 13), c.1096_1097del (exón 10), c.1350_1351del (exón 12) y dos pacientes portaban la mutación c.1100dup (exón 10). Dos mutaciones afectan al sitio donador de splicing del exón 6 c.639+1G>T (Orten DJ, 2008), y del exón 15 c.1698+1del; y una última mutación sin sentido c.1748T<C (p.Leu583Pro) se encuentra en el exón 16 (Richard S, 2000). La mayoría de estas mutaciones se sitúan en el dominio *eya1HR* (*eya* homologous region), un dominio muy conservado del gen *EYAI*, y no se encuentran descritas en las bases de datos (1000genomas, 6500exomas y Ciberer Exome Server).

Los pacientes sin mutaciones patogénicas encontradas en el gen *EYAI*, fueron secuenciados para el gen *SIX1*, con resultados negativos en todos los casos.

También se analizó la presencia de deleciones en el gen *EYAI* mediante la técnica MLPA. Cuatro pacientes presentaron la delección completa del gen *EYAI*, y dos pacientes portaban deleciones parciales. El paciente B14 tenía una delección de 1013 pares de bases que incluía al exón 7, y el paciente B16 portaba una delección de 78 kb que afectaba a los exones del 6 al 10. Los puntos de corte fueron delimitados en los casos que fue posible (figura 24, tabla 16) diseñando cebadores en las regiones sin delección delimitadas por las sondas del array CGH más cercanas a la delección. Estas muestras fueron empleadas como controles positivos para verificar la sensibilidad de los arrays CGH diseñados en nuestro laboratorio cubriendo todos los genes y loci de

sordera conocidos hasta la fecha (punto 1 de los resultados de esta tesis). Las deleciones parciales fueron correctamente detectadas. El análisis mediante aCGH de las deleciones de todo el gen *EYAI* demostraron que la deleción no incluía solo a este gen, sino también a otros 7 genes situados en su extremo 5': *XKR9*, *LACTB2*, *TRAM1*, *NCOA2*, *PRDM14*, *SLCO5A1* y *SULF1*. Es posible que esta deleción tenga los mismos puntos de corte en todos los pacientes, debido a que las sondas que lo delimitan en el array son las mismas. Basándonos en las posiciones cromosómicas de estas sondas, estimamos que la deleción tiene un tamaño de entre 2.6 Mb y 2.76Mb, y observamos que estaba rodeada por una región de 6 kb de elementos repetitivos tipo LTR/ERV1. Estos elementos repetitivos pueden ser los causantes del reordenamiento cromosómico que origina esta enfermedad, los cuales se han observado también en otros pacientes (Brophy PD, 2013).

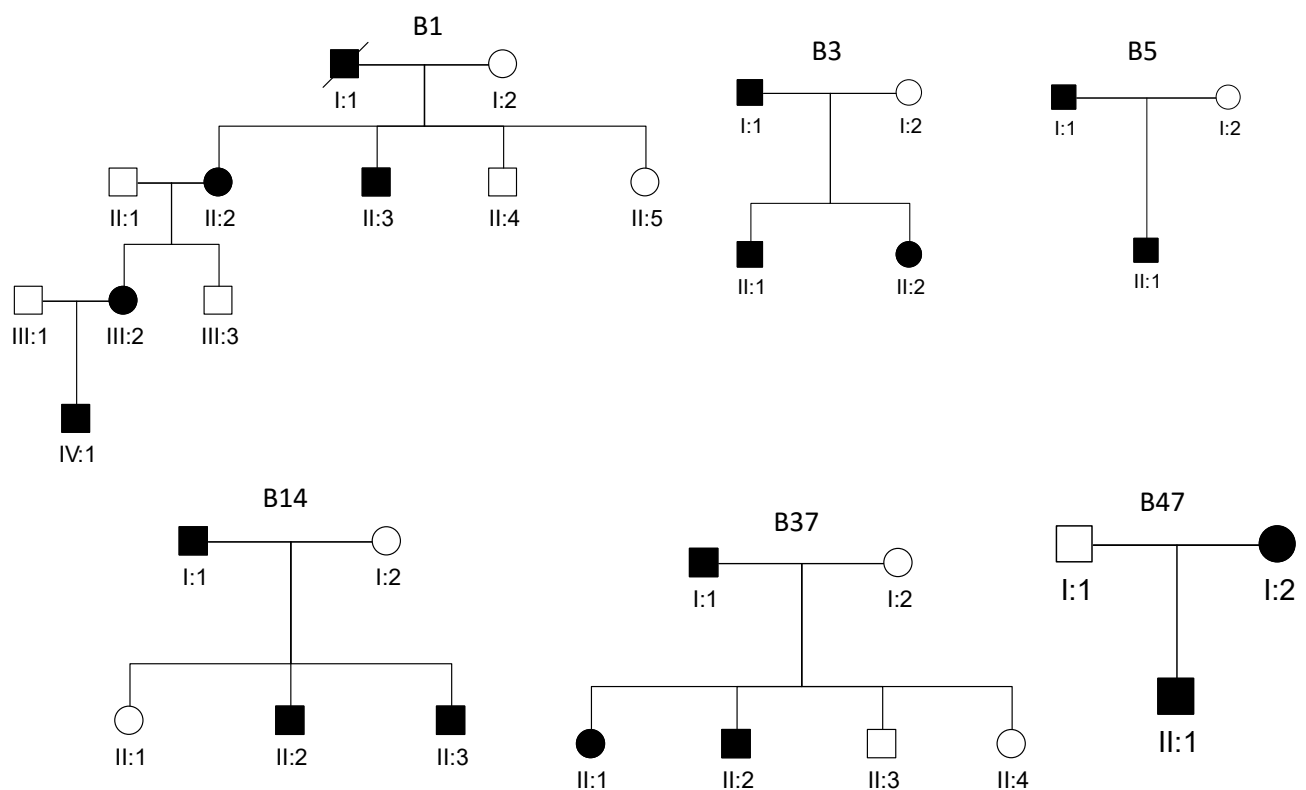


Figura 22: Árboles genealógicos de las familias con más de un individuo afectado con el Síndrome de BOR.

| Familia (Paciente) | Origen | Criterios mayores | | | | Criterios menores | | | | | Familiares BOR | EYA1 (NM000503.5) |
|-----------------------|----------|--------------------------|---------------------------|---------|----------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------------------|
| | | Problemas branquiales | Fositas preauriculares | Sordera | Problemas renales | Malformaciones oído externo | Malformaciones oído medio | Malformaciones oído interno | Asimetría facial | Malformación del paladar | | |
| B1 (II:2) | Cuba | X | X | X | X | | | | | | X | c.1081C>T p.Arg361* |
| B1 (II:3) | Cuba | X | X | X | | | | | | | | |
| B1 (III:2) | Cuba | X | X | X | X | | | | | | X | c.1081C>T p.Arg361* |
| B1.7 (IV:1) | Cuba | X | X | X | X | | | | | | X | c.1081C>T p.Arg361* |
| B3 (I:1) | España | X | | X | X | | | | | | X | c.1411del p.Ile471Leufs*4 |
| B3 (II:1) | España | X | | X | X | | | | | | X | c.1411del p.Ile471Leufs*4 |
| B3 (II:2) | España | X | | | | | | | | | X | c.1411del p.Ile471Leufs*4 |
| B4 | España | X | | X | ? | | | | | | | Deleción EYA1 |
| B5 (I:1) | España | X | X | X | X | | | | | X | X | c.922C>T p.Arg308* |
| B5 (II:1) | España | X | X | X | X | | | | | X | X | c.922C>T p.Arg308* |
| B8 | España | X | X | X | | | | | | | | Deleción EYA1 |
| B9 | Francia | | | X | X | X | | X | | | | Deleción EYA1 |
| B12 | España | | X | | X | | | | | | X | c.1081C>T p.Arg361* |
| B14(I:1) | España | X | X | X | | | | | | | | Deleción ex7 EYA1 |
| B14 (II:2) | España | X | X | | | | | | | | | Deleción ex7 EYA1 |
| B14(II:3) | España | X | X | | X | | | | | | X | Deleción ex7 EYA1 |
| B15 | España | X | X | X | | | | | | | X | c.1081C>T p.Arg361* |
| B16 | España | X | | X | X | X | | | | | ? | Deleción ex6-10 EYA1 |
| B17 | España | X | | X | X | | | | | | | c.1096_1097del p.Ile366Phefs*11 |
| B18 | España | X | X | ? | X | | | | | | ? | c.1100dup p.Phe367Phefs*10 |
| B28 | Portugal | X | | | X | | | | | | | c.980G>A p.Trp327* |
| B36 | España | | X | | X | | | | | X | | c.845del p.Ser282Thrfs*184 |
| B37 (I:1) | Túnez | X | | X | | | | | | | X | c.1698+1del |
| B37(II:1) | Túnez | X | | X | | | | | | | X | c.1698+1del |
| B37(II:2) | Túnez | X | | X | | | | | | | X | c.1698+1del |
| B38 | Túnez | X | | | X | | | | | | ? | c.1350_1351del p.Asn450Lysfs*10 |
| B40 | España | X | X | | X | X | | | | | ? | Deleción EYA1 |
| B43 | Túnez | ? | ? | ? | ? | | | | | | | c.1748T>C p.Leu583Pro |
| B47 (I:2) | España | X | X | X | | | | | | | X | c.880C>T p.Arg294* |
| B47 (II:1) | España | X | X | | | X | | | | | X | c.880C>T p.Arg294* |
| B48 | España | X | X | X | ? | | X | | | | | c.639+1G>T |

Tabla 14: Características clínicas de los pacientes de BOR incluidos en este estudio.

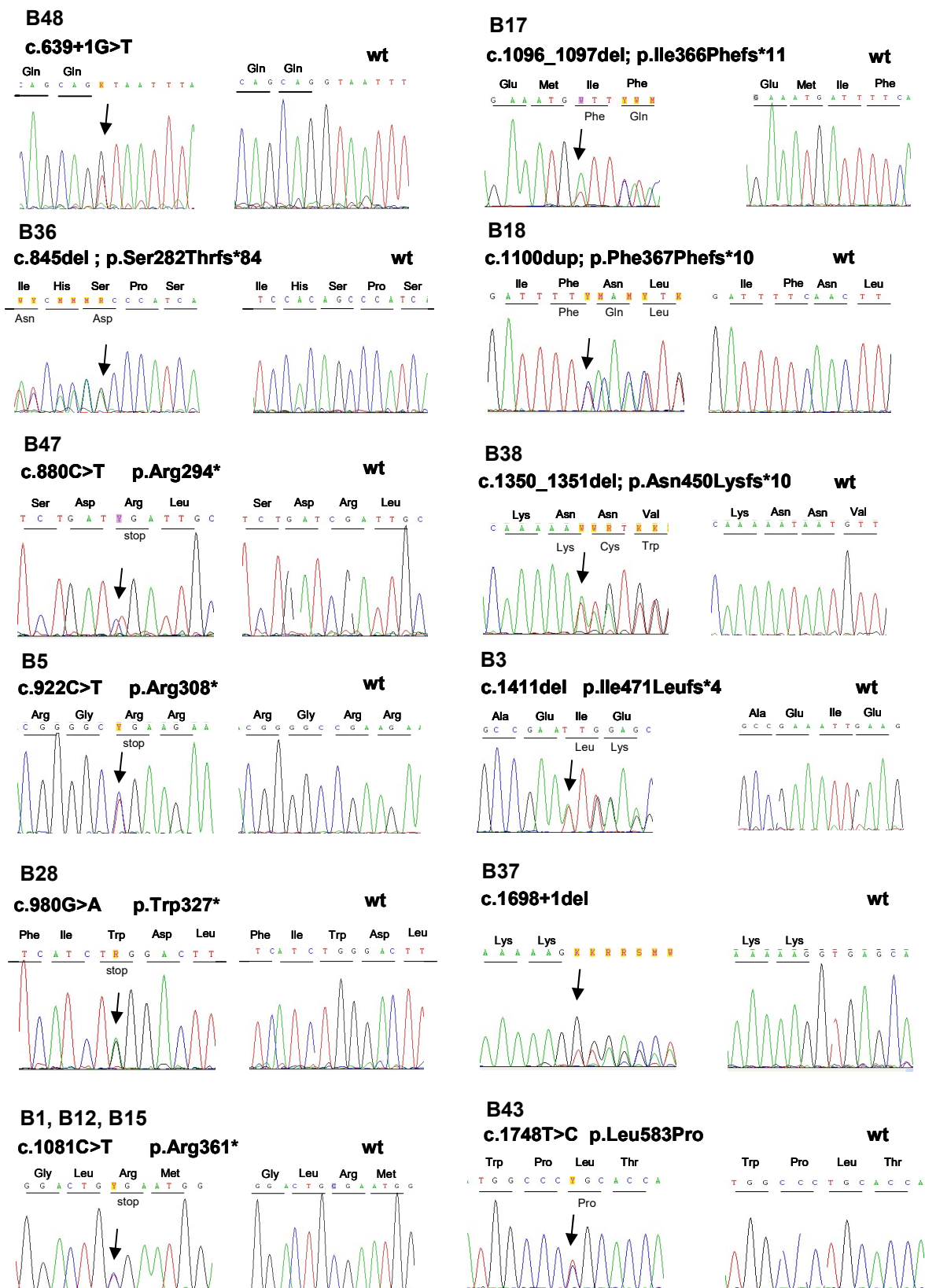


Figura 23: Electroferogramas con las mutaciones encontradas en el gen *EYAI* tras la secuenciación Sanger de los pacientes de BOR, y la secuencia silvestre.

| Familia | EYA1 (NM000503.5) | Tipo de mutación | Exón | Referencia |
|--------------|---------------------------------|------------------------|--------|--------------------|
| B48 | c.639+1G>T | Procesamiento | ex 6 | Orten DJ, 2008 |
| B36 | c.845del p.Ser282Thrfs*84 | Afecta fase de lectura | ex 8 | Este trabajo |
| B47 | c.880C>T p.Arg294* | Sin sentido | ex 8 | Richard S, 2000 |
| B5 | c.922C>T p.Arg308* | Sin sentido | ex 8 | Abdelhak S, 1997 |
| B28 | c.980G>A p.Trp327* | Sin sentido | ex 9 | Este trabajo |
| B1, B12, B15 | c.1081C>T p.Arg361* | Sin sentido | ex 10 | Olavarieta L, 2008 |
| B17 | c.1096_1097del p.Ile366Phefs*11 | Afecta fase de lectura | ex 10 | Este trabajo |
| B18 | c.1100dup p.Phe367Phefs*10 | Afecta fase de lectura | ex 10 | Este trabajo |
| B38 | c.1350_1351del p.Asn450Lysfs*10 | Afecta fase de lectura | ex 12 | Este trabajo |
| B3 | c.1411del p.Ile471Leufs*4 | Afecta fase de lectura | ex 13 | Este trabajo |
| B37 | c.1698+1del | Procesamiento | ex 15 | Este trabajo |
| B43 | c.1748T>C p.Leu583Pro | Cambio de sentido | ex 16 | Richard S, 2000 |
| B4 | - | Deleción | Todos | Song ME. 2013 |
| B8 | - | Deleción | Todos | Song ME. 2013 |
| B9 | - | Deleción | Todos | Song ME. 2013 |
| B14 | - | Deleción | Ex7 | Este trabajo |
| B16 | - | Deleción | Ex6-10 | Este trabajo |
| B40 | - | Deleción | Todos | Song ME. 2013 |

Tabla 15: Mutaciones patogénicas encontradas en el gen *EYA1*, indicando las familias en las que se han encontrado, y referencias bibliográficas (NM000503.5).

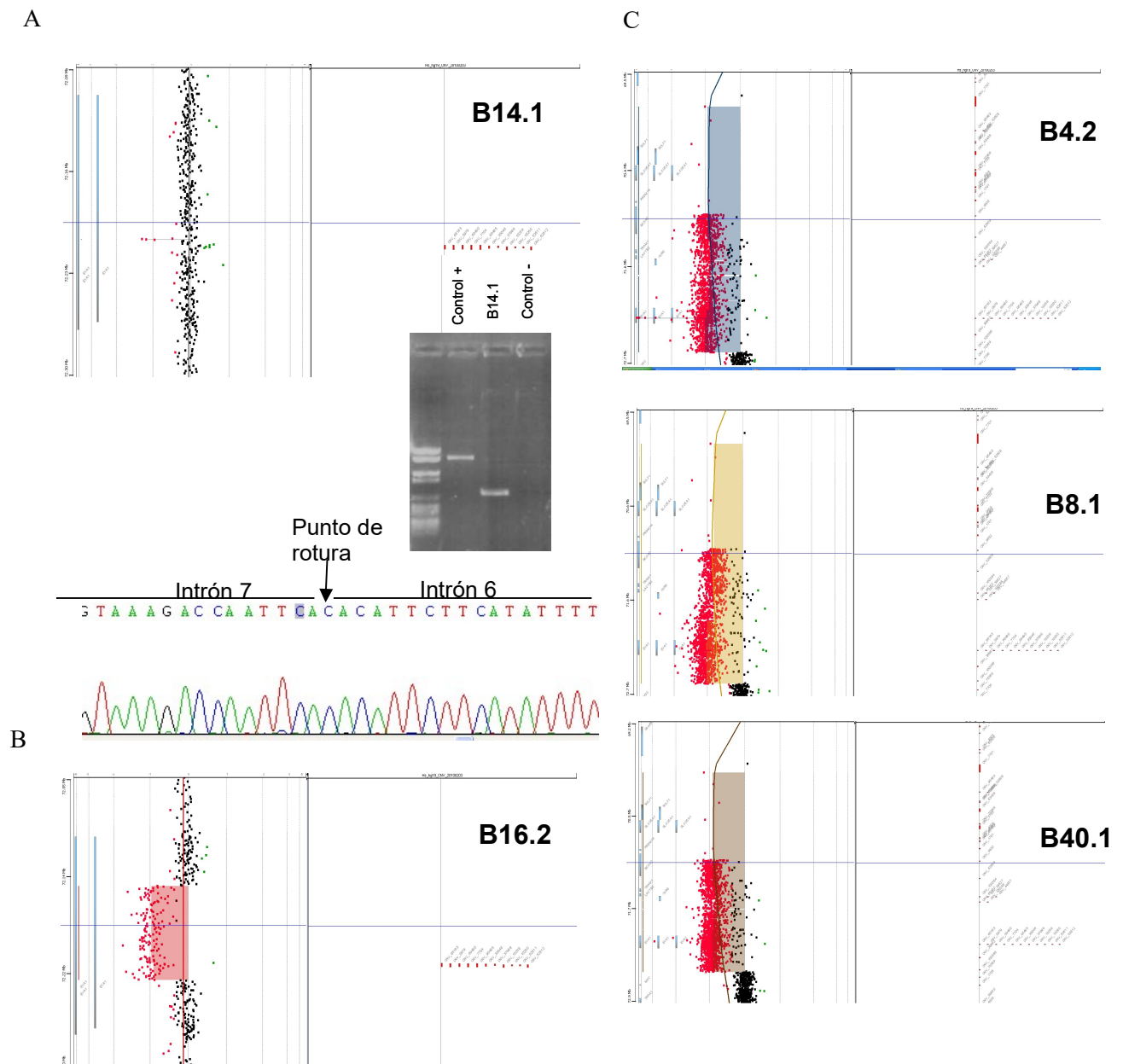


Figura 24: Deleciones detectadas por aCGH en *EYAI*. A. Deleción del exón 7 en el paciente B14.1. Gel de agarosa en el que se indica la diferencia de tamaños del paciente con respecto a un individuo control, y electroferograma indicando el punto en el que se ha producido la deleción. B. Deleción de los exones 6-10 en el paciente B16.2. C. Deleción completa del gen *EYAI* y otros 7 genes contiguos en los pacientes B4.2, B8.1 y B40.1.

| Paciente | Coordenadas última Sonda con valor $\log_2[r/v]=0$ | Coordenadas primera Sonda con valor $\log_2[r/v]\neq 0$ | Coordenadas última Sonda con valor $\log_2[r/v]\neq 0$ | Coordenadas primera Sonda con valor $\log_2[r/v]=0$ | Tamaño mínimo de la delección (pb) | Genes deletados |
|----------|--|---|--|---|------------------------------------|--|
| B4.2 | chr8:69836784-69836843 | chr8:69955127-69955186 | chr8:72586827-72586886 | chr8:72593068-72593127 | 2.631.759 | <i>XKR9</i> , <i>LACTB2</i> , <i>TRAM1</i> , <i>NCOA2</i> , <i>PRDM14</i> , <i>SLCO5A1</i> , <i>SULF1</i> , <i>EYA1</i> |
| B8.1 | chr8:69836784-69836843 | chr8:69955127-69955186 | chr8:72586827-72586886 | chr8:72593068-72593127 | 2.631.759 | <i>XKR9</i> , <i>LACTB2</i> , <i>TRAM1</i> , <i>NCOA2</i> , <i>PRDM14</i> , <i>SLCO5A1</i> , <i>SULF1</i> , <i>EYA1</i> |
| B40.1 | chr8:69836784-69836843 | chr8:69955127-69955186 | chr8:72586827-72586886 | chr8:72593068-72593127 | 2.631.759 | <i>XKR9</i> , <i>LACTB2</i> , <i>TRAM1</i> , <i>NCOA2</i> , <i>PRDM14</i> , <i>SLCO5A1</i> , <i>SULF1</i> , <i>EYA1</i> |
| B14.1 | chr8:72210154-72210213 | chr8:72210604-72210663 | chr8:72211463-72211522 | chr8:72211853-72211912 | 918 | Ex7 <i>EYA1</i> |
| B16.2 | chr8:72150271-72150330 | chr8:72150577-72150636 | chr8:72228926-72228985 | chr8:72229209-72229268 | 78408 | Ex 6-10 <i>EYA1</i> |

Tabla 16: Coordenadas de las sondas que delimitan las deleciones detectadas por aCGH en pacientes del Síndrome de BOR, indicando el tamaño mínimo de la delección y los genes que incluyen.

DISCUSSION

DISCUSION

La hipoacusia es una enfermedad muy heterogénea genéticamente. Hasta el momento se han descrito 94 genes con un número de exones que puede variar entre 2 y más de 60. Esto hace que el estudio genético-molecular de esta patología mediante las técnicas clásicas (secuenciación Sanger entre otras) haya sido ineficiente, hasta la aparición de las técnicas de última generación como son la NGS y los microarrays. La secuenciación masiva, junto con los sistemas de enriquecimiento de secuencia, ha permitido aumentar notablemente el rendimiento en el diagnóstico genético de los pacientes con hipoacusia autosómica dominante. El abordaje tradicional consistía en una aproximación por gen ya descrito, seleccionando los genes que se analizaban por secuenciación Sanger según el fenotipo observado de los pacientes (Morín M. 2009), a ser capaces de secuenciar todos los genes implicados en hipoacusia hereditaria no sindrómica en un único evento de secuenciación masiva.

Gracias al diseño desarrollado y validado en este trabajo (OTO-NGS-Panel), hemos sido capaces de obtener una tasa de diagnóstico del 44% en los pacientes analizados con hipoacusia autosómica dominante en población española. Realizar comparaciones de nuestros resultados con otros estudios es complicado, puesto que hay pocos estudios de secuenciación masiva en los que se presente la tasa de diagnóstico obtenida según el tipo de herencia genética de la hipoacusia. El análisis de 100 pacientes con la plataforma OtoSCOPE® (sistema que captura las regiones exónicas de 66 genes causantes de hipoacusia utilizando tecnología SureSelect y plataforma de secuenciación Illumina), obtuvo una tasa de diagnóstico del 42% (Shearer AE. 2013). Pero tan solo 29 de estos pacientes presentaban hipoacusia AD, y la tasa de diagnóstico obtenida en este subgrupo poblacional fue del 31%. Brownstein y colaboradores desarrollaron un sistema de captura de secuencia de tecnología SureSelect (Agilent) incluyendo un total de 246 genes causantes de hipoacusia descritos tanto en humano como en ratón, que fueron secuenciados en una plataforma Illumina (Illumina Genome Analyzer Iix); obteniendo una tasa de diagnóstico del 100% de las muestras de hipoacusia AD (Brownstein Z. 2011). Es importante mencionar que en este caso la cohorte de pacientes era muy reducida (tan solo 2 de los 11 pacientes analizados presentan hipoacusia AD), por lo que este resultado es poco significativo. Utilizando el mismo sistema de captura que incluía 112 genes (76 genes de hipoacusia y 36 genes detectados por análisis de microarrays con alta expresión en oído interno de humano), y la misma plataforma de

secuenciación (GA IIx), Miyagawa y colaboradores obtuvieron una tasa de diagnóstico del 43,3% de las 30 muestras con hipoacusia AD analizadas (Miyagawa M. 2013). En otro sistema de captura desarrollado con tecnología Ion AmpliSeq v1.2 (Life Technologies) se incluyeron 96 genes de hipoacusia en humanos. Tres familias con hipoacusia AD fueron analizadas, y tan solo una fue diagnosticada (tasa de diagnóstico del 33%) (Vozzi D. 2014). Hasta ahora, todos los estudios encontrados presentan un menor número de pacientes con hipoacusia AD analizados, y porcentajes de diagnóstico muy variables según el volumen muestral. Un estudio reciente utilizando la misma plataforma OtoSCOPE® analizó 1119 pacientes, de los cuales 141 presentan hipoacusia AD (Sloan-Heggen CM. 2016). En este subgrupo poblacional la tasa de diagnóstico obtenida fue del 44,6%. Los resultados de este estudio son comparables a nuestros resultados obtenidos, tanto en volumen muestral como en porcentaje de diagnóstico obtenido.

La prevalencia de los genes involucrados en la hipoacusia depende de la población incluida en el estudio. Este es el primer trabajo de epidemiología genética en pacientes españoles con hipoacusia AD utilizando herramientas de secuenciación masiva. Los genes con mayor prevalencia encontrados en nuestro grupo muestral son *TECTA* (11%), *MYO6* (8%) y *POU4F3* (5%). En el estudio de Sloan-Heggen (Sloan-Heggen CM. 2016) los pacientes no pertenecían a una región geográfica concreta, y los genes con mayor prevalencia encontrados fueron *TECTA* (23,8%) y *KCNQ4* (9,5%). En ambos estudios es el gen *TECTA* el que tiene mayor prevalencia en pacientes de hipoacusia AD. En nuestro estudio, el 11% de las familias analizadas mediante OTO-NGS-Panel (12 pacientes de 110 analizados) presentan una mutación en el gen *TECTA* que segrega con la enfermedad (fig 17). En un estudio previo realizado empleando análisis mediante dHPLC, se establece que la prevalencia de este gen en pacientes españoles de hipoacusia autosómica dominante es del 4,5% (17 familias con hipoacusia AD y mutaciones en el gen *TECTA* sobre 374 familias totales analizadas) (Hildebrand MS. 2011). En otro estudio realizado con la plataforma de secuenciación masiva OtoSCOPE® se obtiene un resultado del 6,9% (2 familias con hipoacusia AD y mutaciones en el gen *TECTA* sobre 29 familias de hipoacusia AD totales analizadas) (Shearer AE. 2013). Todos los estudios ratifican la prevalencia del gen *TECTA* en la hipoacusia AD, aunque los datos varían según las poblaciones analizadas.

El gen *TECTA* codifica para la proteína α -tectorina, la cual constituye la mayor proteína no colagenosa de la membrana tectórica, y posee tres dominios estructurales: el dominio entectina (ENT), el dominio zona adhesina (ZA), y el dominio zona pelúcida (ZP). Las mutaciones que hemos encontrado están repartidas a lo largo de los tres dominios de la proteína. La nueva mutación p.Thr190Met encontrada en la familia AD5 afecta al dominio Entactina y, al igual que las mutaciones descritas en dicho dominio, afecta a las frecuencias medias. La mutación p.Arg1095Cys (AD16) se encuentra en el dominio ZA, en la zona que conecta los dominios vWFD2 y D3, y muestra afectación en frecuencias altas. La mutación p.Cys1464Phe (AD96) se encuentra en el dominio ZA, en la zona que conecta TIL3 y WFD4, y genera una hipoacusia que afecta a frecuencias altas; y la mutación p.Cys1665Tyr (AD116) se encuentra en el dominio ZA (vWFD4) pero no tenemos audiometría del probando. El resto de mutaciones ya estaban descritas en la bibliografía: dos familias con la mutación p.Cys1517Arg (AD25 y AD109) (Hildebrand MS. 2011) afectando al dominio ZA (vWFD4) que afecta a las frecuencias altas, y el resto de mutaciones se encuentran dentro del dominio ZP, que es el que contiene mayor porcentaje de mutaciones conocidas: 3 familias con la mutación p.Cys1837Gly (AD17, AD34, AD56) (Moreno-Pelayo MA. 2001), dos familias con la mutación p.Arg1890Cys (AD15 y AD24) (Platinga RF. 2006), y una familia con la mutación p.Thr1866Met (AD35) (Sagong B. 2010).

Dada la prevalencia que tiene el gen *TECTA* en pacientes de hipoacusia AD, es importante hacer mención a aquellas mutaciones encontradas en este gen que no segregan con la enfermedad en la familia, por lo que no se consideran causantes de su enfermedad: p.Tyr1946His (AD38), p.Asp1151Asn (AD46) y p.Thr261Ala (AD92). Estos pacientes han sido diagnosticados con mutaciones en otros genes (Tabla 12). Se ha analizado la posibilidad de que estas mutaciones *TECTA* “acompañantes” modifiquen el fenotipo de los individuos que las poseen, pero en ninguno de los casos se han observado diferencias entre unos pacientes y otros.

MYO6 es el segundo gen más representado en nuestra población de estudio, con un total de 9 familias con hipoacusia AD diagnosticadas (8%). Clásicamente no se analizaba rutinariamente en la práctica clínica, ya que es un gen grande, con más de 30 exones. No obstante, Brownstein et al demostraron la importancia de los genes que codifican proteínas de la familia de las miosinas en pacientes con hipoacusia (Brownstein Z. 2014). En un estudio de epidemiología genética en pacientes japoneses,

se diagnosticaron dos pacientes de hipoacusia AD con mutaciones en este gen sobre un total de 30 pacientes con hipoacusia AD analizados (6,6%) (Miyagawa M. 2013). Sloan-Heggen describe 4 casos de pacientes con hipoacusia AD con mutaciones en *MYO6* sobre un total de 63, lo que supone un 6,3% (Sloan-Heggen CM. 2016). *MYO6* codifica la proteína miosina VI, la cual es una actina motora responsable del transporte intracelular de proteínas, vesículas y orgánulos (Hasson T. 2003). Las mutaciones encontradas se distribuyen a lo largo de todo el gen, seis de ellas no habían sido publicadas con anterioridad, y todas se asocian a familias con un fenotipo de hipoacusia progresiva, que afecta a las frecuencias medias y altas mayoritariamente, y una edad de manifestación tardía.

Hemos encontrado mutaciones en el gen *POU4F3* en cinco familias (5% de la población en estudio). Las cinco mutaciones son nuevas: p.Trp251* (AD23), p.Arg193Pro (AD30), p.Ser237Alafs*65 (AD32), p.Ser224Arg (AD72) y p.Asn240Lys (AD123). Las características fenotípicas concuerdan con lo descrito previamente, al presentar hipoacusia AD afectando inicialmente a las frecuencias medias y progresando a las altas con el tiempo (Kim HJ. 2013).

En los pacientes españoles de hipoacusia AD analizados con OTO-NGS-Panel también se han encontrado mutaciones, aunque en menor proporción, en los siguientes genes: *MYO7A* (3%), *DFNA5* (3%), *EYA4* (2%), *KCNQ4* (2%), *WFS1* (2%) y *MYH14* (2%).

Se han encontrado mutaciones en el gen *MYO7A* en tres de las familias analizadas: AD38 (c.2763_2765del), AD60 (p.Val1319Ile) y AD121 (c.3763del). Ninguna de las 3 mutaciones había sido descrita anteriormente. La mayoría de las mutaciones en este gen están relacionadas con hipoacusia de herencia recesiva (DFNB2) o con el Síndrome de Usher tipo B, y una pequeña proporción de ellas resulta en hipoacusia de herencia dominante (DFNA11) (Liu XZ. 1997, Liu XZ 1997, Weil D. 1995). El mecanismo que regula uno u otro tipo de herencia aún se desconoce, aunque se propone la hipótesis de que las mutaciones de herencia recesiva resultan en procesos de degradación de ARN mensajeros con codones de terminación prematuros (Nonsense Mediated Decay), mientras que las mutaciones que resultan en fenotipos de herencia dominante exhiben un mecanismo de patogénesis de dominancia negativa (Sang Q. 2013). La hipoacusia de

estos pacientes afecta a todas las frecuencias, y con la edad empeora sobre todo en las frecuencias altas.

Las familias con mutaciones encontradas en el gen *DFNA5* fueron: AD104, con el cambio en el sitio aceptor de procesamiento del intrón 7 (c.991-2A>G) ya publicado anteriormente (Chai Y.2014), y dos familias (AD67 y AD102) con un cambio nuevo c.1270_1273del que afecta al exón 10 del gen. Esta es la primera vez que se publica un cambio patogénico en este gen que no se encuentra en el exón 8 (de Beeck KO. 2012, Chai Y. 2014). Probablemente no se hayan encontrado mutaciones en otros exones de este gen debido a que los diferentes estudios se centran únicamente en la secuenciación del exón 8 y los sitios intrónicos adyacentes, pues son las zonas descritas con mutaciones causantes de sordera DFNA5. Este estudio revela la necesidad de realizar un estudio genético del gen completo y pone en relieve la eficacia de la secuenciación masiva en esta labor.

Se han encontrado dos familias con mutaciones nuevas en el gen *EYA4*: AD4 con la mutación p.Thr261Argfs*34 y AD33 con el cambio p.Pro360Thr. Los afectados de estas familias presentan una hipoacusia con afectación de las frecuencias medias y altas. La mayoría de las mutaciones descritas en el gen *EYA4* causantes de hipoacusia son mutaciones que causan la terminación prematura de la proteína. La mutación p.Pro360Thr es la quinta mutación con cambio de sentido descrita en este gen como causante de hipoacusia (Tan M. 2014, Sun Y. 2015, Chang MY. 2014, Liu F. 2015).

Las mutaciones encontradas en *KCNQ4* fueron: p.Leu209Arg (AD43) y p.Tyr286Cys (AD94), ninguna de las cuales había sido descrita con anterioridad. Las audiometrías de ambas familias muestran una hipoacusia que afecta principalmente a frecuencias medias y altas.

Dos familias (AD36 y AD105) fueron diagnosticadas con el mismo cambio ya descrito en el gen *WFS1*: p.Arg703His (Sun Y. 2011). Ambas familias poseen afectados con hipoacusia progresiva que afectan a las frecuencias graves y medias principalmente, que son las características típicas de hipoacusia debidas a mutaciones en este gen (Cryns K. 2002).

Las mutaciones encontradas en el gen *MYH14* son: p.Ser120Leu (AD12) (Yang T. 2005), y una delección no descrita de 14 nucleótidos (c.181-195del) en el probando de la

familia AD110. La segregación de esta delección no ha podido ser confirmada en la familia al carecer de ADN para secuenciarlo.

En varias familias se han encontrado mutaciones en dos genes probablemente patogénicas: los afectados de la familia AD65 portan mutaciones en *CCDC50* (c.1356_1386del), esta es la segunda publicada hasta el momento en este gen, ambas por nuestro grupo de investigación, y afecta al exón 11. La publicada originalmente consistía en una duplicación en tándem de 8 nucleótidos (Modamio-Hoybjor S. 2007). Además de esta mutación, en esta familia cosegrega junto con la enfermedad una nueva mutación en *P2RX2* p.Arg39Gln. Los afectados de la familia AD73 presentan con mutaciones en *KCNQ4* (p.Trp276Gly) y *WFSI* (p.Lys800Glu); y el individuo afectado de la familia AD115 porta mutaciones en *EYA4* (p.Glu54*) y *MYO7A* (p.Arg686His). Ninguna de estas mutaciones ha sido descrita con anterioridad, por lo que es necesario ampliar el estudio a otros miembros de las familias.

En la era preNGS diríamos que uno u otro gen es el responsable de la hipoacusia de los pacientes. Ahora, con las técnicas de secuenciación masiva se complica el consejo genético, puesto que, como hemos visto, a veces pueden aparecer varias mutaciones probablemente patogénicas en un mismo individuo y resulta difícil discernir cuál de las dos, o si ambas son las causantes del fenotipo.

Mediante la aplicación de la secuenciación masiva también hemos identificado varias mutaciones descritas como patogénicas en la literatura que no segregaban en nuestras familias, poniendo en duda su patogenicidad. Este es el caso de la mutación p.Gly376Cys en *MYH14* (Donaudy F. 2004), que fue encontrada en dos probandos de familias independientes y que en ningún caso segregaba con la enfermedad en las familias (AD48 y AD58). Otro ejemplo lo encontramos en la familia AD35, cuyos afectados, además de poseer la mutación patogénica en *TECTA* p.Thr1866Met (Sagong B. 2010), portaban la mutación p.Lys193Gln en *WFSI* (Cryns K. 2002). Esta mutación está presente en 2 individuos sanos de la base de datos de población española Ciberer Exome Server, por lo que puede ser considerada como un polimorfismo. Un último ejemplo lo encontramos en la familia AD22, cuyo probando posee el cambio p.Arg93* en el gen *MYO1A* (NM_005379) (Donaudy F. 2003) mutación que no estaba presente en ningún otro afectado de la familia. En el artículo de Donaudy la mutación estaba presente en el probando y su madre, de la cual no había datos fenotípicos.

Recientemente se ha publicado un estudio empleando secuenciación masiva cuyos resultados descartaban a *MYO1A* como gen causante de hipoacusia (Eisenberger T. 2014).

A pesar del sustancial incremento de casos diagnosticados mediante la aplicación de OTO-NGS-Panel, el 56% de los pacientes incluidos en el estudio no han podido ser diagnosticados. Esto puede deberse a genes desconocidos que tengan una importante implicación en esta patología, o a cambios que la secuenciación masiva no pueda detectar, como las grandes deleciones, duplicaciones o inversiones. Del mismo modo, desde que fue generado nuestro panel, nuevos genes han sido publicados como causantes de hipoacusia, por lo que es necesario hacer un continuo desarrollo de esta tecnología para conseguir mejorar ese porcentaje de diagnóstico.

Como herramienta complementaria, la técnica del array CGH permite analizar la presencia de deleciones o inserciones de varios genes en el mismo ensayo. Entre nuestros pacientes de hipoacusia no sindrómica no hemos detectado ninguna CNV patogénica, pero es conveniente continuar analizando muestras, puesto que varios artículos demuestran que estas variaciones pueden provocar hipoacusia (Hoppman N. 2013, Freitas EL. 2014), aunque previsiblemente con baja prevalencia.

HIPOACUSIA SINDRÓMICA

En nuestro objetivo de caracterizar mejor algunos tipos de hipoacusia sindrómica hemos analizado por secuenciación Sanger 14 pacientes del Síndrome de Stickler. De ellos, el 43% fueron diagnosticados con mutaciones en el gen *COL2A1*. Cinco de las mutaciones encontradas generan la aparición de codones de terminación prematuros, producidas por pequeñas deleciones o inserciones, o por variaciones que afectan al procesamiento del ARN. Estas últimas mutaciones provocan el uso de sitios crípticos de procesamiento, alterando la fase de lectura del ARN mensajero, como hemos demostrado con la mutación c.430-1G>A de la familia SS39. El mecanismo de patogénesis aceptado para este síndrome es un efecto de haploinsuficiencia producido por una degradación de ARNm (Richards AJ. 2006). Los rasgos clínicos de los pacientes de Stickler tipo 1 son muy diversos, y con penetrancia incompleta, lo que sugiere que existe un efecto de dosis. Entre nuestros pacientes, el 86 % presenta miopía, el 57 % presentan desprendimiento de retina, y el 30% presenta hipoacusia que afecta a las frecuencias altas, datos similares a los publicados hasta ahora (Hoornaert KP. 2010,

Acke FR. 2012). Hay gran variabilidad fenotípica intrafamiliar. Esta variabilidad fenotípica es más evidente en los rasgos esqueléticos, de modo que los diferentes individuos solo comparten el fenotipo de hiperlaxitud articular. Los rasgos faciales son también característicos de los pacientes de Stickler, el 86 % presenta malformaciones en la mandíbula, el 28 % presenta fisura palatina, y el 43 % presenta paladar hendido. En estos datos no hemos incluido la clínica de la familia SS61, que presentaba una mutación con cambio de sentido en el gen *COL2A1*. Analizando los rasgos clínicos de este paciente observamos que son los que más difieren del resto de los pacientes de Stickler. Es un paciente sin rasgos oculares y con numerosas afectaciones esqueléticas. La mutación encontrada y los rasgos clínicos indican que es posible que este paciente no deba ser diagnosticada clínicamente con el síndrome de Stickler, sino con una alteración más compleja a nivel esquelético como la displasia otopondilomegaepifisial (OSMED: OMIM215150), displasia espondiloepimetaepifisial (SMED: OMIM184250) o displasia espondiloperiferal (OMIM271700).

La familia S722 representa el cuarto ejemplo de síndrome de Stickler tipo 4 a nivel mundial de herencia AR asociada a *COL9A1*. Hay dos familias marroquíes con la mutación p.Arg295* (Van Camp G. 2006, Nikopoulos K. 2011), y una familia turca con la mutación p.Arg507* (Nikopoulos K. 2011). Esta familia española es el primer ejemplo de Stickler tipo 4 con una mutación que afecta al marco de lectura de la proteína (c.2074dup). Todos estos pacientes presentan la mutación en homocigosis, y comparten la hipoacusia neurosensorial de afectación en frecuencias altas. Los problemas oculares son importantes en todos los pacientes, aunque variados, y tan solo el 50% de ellos presenta malformaciones faciales. Un rasgo que poseen los pacientes de Stickler recesivo tipo 4 publicados anteriormente, pero que no comparte nuestra familia, es la baja estatura de los individuos afectados, fenotipo no típicamente presente en pacientes de Stickler, pero que sí ha sido considerada como una característica del Stickler recesivo (Baker S. 2011). El resto de las características esqueléticas son más numerosas y variadas en los pacientes de Stickler recesivo tipo 4 que las presentes en los casos de Stickler tipo 1. Algunos de los familiares sanos portadores de las mutaciones en heterocigosis presentan características fenotípicas aisladas, como miopía, cara plana, baja estatura, o problemas en la columna (Van Camp G. 2006, Nikopoulos K. 2011). En nuestra familia española tan solo un hermano del paciente probando refería astigmatismo, un problema ocular muy presente en la población española.

Para estudiar pacientes con características clínicas del Síndrome de BOR hemos secuenciado los genes *EYA1* y *SIX1*, y hemos analizado posibles deleciones del gen *EYA1* mediante MLPA. En total hemos sido capaces de diagnosticar genéticamente el 40 % de los 50 pacientes del síndrome de BOR analizados, todos con cambios en el gen *EYA1*. Este porcentaje es similar al encontrado en otros estudios (Abdelhak S. 1997). De nuestros pacientes, el 70 % poseen mutaciones puntuales o pequeñas deleciones que afectan a la región EYA-HR, muy conservada entre especies, y donde se encuentran la mayoría de las mutaciones publicadas hasta el momento (Vervoort VS. 2002). Inicialmente se hablaba de haploinsuficiencia como mecanismo molecular causante de esta patología (Zhang Y. 2004), pero se han publicado artículos que hablan de un posible efecto dominante negativo de los mutantes que llegan a transcribirse (Stockley TL. 2009). La combinación de ambos mecanismos podría justificar la enorme variabilidad de fenotipo en los pacientes. En nuestro caso, la mayoría de las mutaciones que hemos encontrado generan una terminación prematura de la proteína. Dos mutaciones afectan a sitios donadores de procesamiento en el exón 15 (familia B37) y en el exón 6 (familia B48). Un predictor bioinformático de los sitios de procesamiento (Reese MG. 1997: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) indica que el último nucleótido del exón 15 de la cadena mutada sería utilizado como sitio donador alternativo, lo que generaría una proteína más larga de lo normal (p.Lys566Asnfs*72) en los afectados de la familia B37. En el exón 6, tras la desaparición del sitio donador de procesamiento, se utilizaría como sitio donador un sitio alternativo situado 147pb aguas arriba, lo que generaría una proteína aberrante con terminación prematura p.Gln213Glnfs*3 en los afectados de la familia B48. La última mutación encontrada resulta en un cambio de aminoácido (p.Leu583Pro) en la familia B43, que según estudios previos desestabiliza la estructura de la proteína, lo que afecta a las interacciones entre EYA1 y otras proteínas, como la familia de proteínas Six, cuya función es facilitar el transporte de EYA1 al núcleo (Patrick AN. 2013). Con lo cual, esta variante no sería transportada al núcleo. Además, esta interacción protegería a las proteínas EYA1 de ser ubiquitinadas y degradadas por la maquinaria proteasómica, por lo que en este caso actuaría el mecanismo de haploinsuficiencia en la enfermedad (Musharraf A. 2014). Según Musharraf y colaboradores, las mutaciones que desembocan en un efecto dominante negativo generan un fenotipo más severo de la enfermedad.

El análisis de pacientes del síndrome de BOR mediante la herramienta de array aCGH permitió el descubrimiento de deleciones que incluían hasta 7 genes contiguos al gen *EYAI* (*XKR9*, *LACTB2*, *TRAM1*, *NCOA2*, *PRDM14*, *SLCO5A1*, *SULF1*). No se han encontrado diferencias entre el fenotipo de estos pacientes, ni los publicados por Brophy y colaboradores (Brophy PD, 2013) y aquellos que tan solo tienen deleciones afectando solo al gen *EYAI*. De entre todos estos genes, en la bibliografía se describen 4 familias con deleciones en los genes *SLCO5A1* y *SULF1*. Estas familias han sido diagnosticadas con el síndrome de Mesomelia-Sinostosis (MSS) (Isidor B. 2010), una osteocondrodisplasia sindrómica caracterizada por numerosas alteraciones óseas, craneofaciales, y en algunos casos polidactilia, problemas cardíacos, hidronefrosis, miopía e hipoacusia. Alguno de los síntomas esporádicos se solapan con los síntomas del síndrome de BOR, pero ninguno de nuestros pacientes tiene alteraciones óseas. En otro estudio (Sanchez –Valle A. 2010) se presenta un paciente con el síndrome de BOR y la misma deleción que nuestros pacientes. En este estudio también se incluyen otros dos pacientes que poseen deleciones mayores que la nuestra, incluyendo 1 y 22 genes contiguos más respectivamente. Los tres pacientes presentan síntomas característicos del síndrome de BOR, junto con baja estatura, y un leve retraso del desarrollo, más agudizado en el último paciente. Rickard S. y colaboradores describen un paciente con una deleción entre los marcadores D8S1797 y el gen *EYAI* (deleción solapante con las deleciones detectadas en los pacientes estudiados en este trabajo, además de otros 12 genes colindantes) y caracterizado clínicamente con el síndrome otofaciocervical (OFC), un síndrome con síntomas típicos de BOR (sordera, fístula branquial, deformidad facial) además de hipoplasia de la musculatura cervical, retraso mental y estatura baja (Rickard S. 2001). Todos estos datos demuestran el avance del conocimiento en este tipo de síndromes gracias al uso de herramientas de nueva tecnología. A pesar de ello, la dificultad de correlacionar el fenotipo con el genotipo de pacientes con este tipo de deleciones es aún elevada.

No hemos sido capaces de determinar el gen y la causa genética de la hipoacusia familiar DFNA49. Puede que esto sea debido a que las técnicas utilizadas no sean capaces de detectarla. Existen evidencias de que la causa genética de la hipoacusia tipo DFNA49 y la hipoacusia DFNY están causadas por el mismo o los mismos genes (Wang Q. 2013). En este artículo se muestra el resultado de un reordenamiento génico complejo (FoSTeS) entre estos dos loci. Como resultado de dicho reordenamiento, una

duplicación de una región de alrededor de 900kb del locus DFNA49 se encuentra en una región repetitiva dentro del locus DFNY. Esta estructura es imposible detectarla por OTO-NGS-Panel, secuenciación del exoma completo o array CGH; por lo que debemos considerar nuevos abordajes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Hemos desarrollado, validado y transferido al mercado una herramienta de diagnóstico basada en tecnología de captura Haloplex y plataforma de secuenciación masiva Illumina (OTO-NGS-Panel) que ha permitido diagnosticar el 44% de los casos familiares de hipoacusia de herencia autosómica dominante analizados en población española. Estos resultados demuestran que el uso de esta tecnología aporta un abordaje coste-efectivo para el diagnóstico de enfermedades con alta heterogeneidad genética. Su aplicación en la práctica clínica ha permitido determinar que los genes más prevalentes de HNSHAD en población española son *TECTA* (11%), *MYO6* (8%) y *POU4F3* (5%).
- 2.- Hemos diseñado, validado y transferido al mercado una herramienta diagnóstica basada en la tecnología de array CGH (OTO-CGH-array) que sirve como herramienta complementaria para el diagnóstico de pacientes de HNSHAD.
- 3.- El estudio genético de 50 pacientes con Síndrome de BOR resultó en una tasa de diagnóstico del 40%. Todas las mutaciones se han encontrado en el gen *EYAI*. La utilización del OTO-CGH-array en la colección de familias con Síndrome de BOR ha permitido concretar con mayor precisión que la técnica MLPA las deleciones en heterocigosis en *EYAI* detectadas en 3 pacientes, lo que ha permitido identificar la pérdida de *EYAI* y otros 7 genes adyacentes.
- 4.- El 43% de un total de 14 pacientes con Síndrome de Stickler analizados poseen mutaciones en el gen *COL2A1*. Además, hemos identificado la primera mutación en *COL9A1* en población española, causante del Síndrome de Stickler tipo 4.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlines branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* 1997; 15:157-164.
- Acke FR, Dhooge IJM, Malfait F, De Leenheer EMR. Hearing impairment in Stickler syndrome: a systematic review. *OJRD* 2012; 7:84.
- Ahmad J, Khan SN, Khan SY, Ramzan K, Riazuddin S, Ahmed ZM, Wilcox ER, Friedman TB, Riazuddin S. DFNB48, a new nonsyndromic recessive deafness locus, maps to chromosome 15q23-q25.1. *Hum Genet* 2005; 116(5):407-12.
- Ahmed ZM, Riazuddin S, Ahmad J, Bernstein SL, GuoY, Sabar MF, Sieving P, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Belyantseva IA, Wilcox ER. PCDH15 is expressed in the neurosensory epithelium of the eye and ear and mutant alleles are responsible for both USH1F and DFNB23. *Hum Molec Genet* 2003; 12: 3215-3223.
- Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaukat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T, Khan SN, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Wilcox ER. Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am. J. Hum. Genet* 2003; 72: 1315-1322.
- Ahmed ZM, Masmoudi S, Kalay E, Belyantseva IA, Mosrati MA, Collin RWJ, Riazuddin S, Hmani-Aifa M, Venselaar H, Kavar MN, Tlili A, van der Zwaag B, and 14 others. Mutations of LRTOMT, a fusion gene with alternative reading frames, cause nonsyndromic deafness in humans. *Nature Genet* 2008; 40: 1335-1340.
- Ahmed ZM, Yousaf R, Lee BC, Khan SN, Lee S, Lee K, Husnain T, Rehman AU, Bonneux S, Ansar M, Ahmad W, Leal SM, Gladyshev VN, Belyantseva IA, Van Camp G, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S. Functional null mutations of MSRB3 encoding methionine sulfoxide reductase are associated with human deafness DFNB74. *Am J Hum Genet* 2011; 88:19-29.
- Ain Q, Nazli S, Riazuddin S, Jaleel A, Riazuddin SA, Zafar AU, Khan SN, Husnain T, Griffith AJ, Ahmed ZM, Friedman TB, Riazuddin S. The autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB72 is located on chromosome 19p13.3. *Hum. Genet* 2007; 122: 445-450.

- Ali G, Santos RL, John P, Wambanqco MA, Lee K, Ahmad W, Leal S. The mapping of DFNB62, a new locus for autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, to chromosome 12p13.2-p11.23. *Clin Genet* 2006; 69(5):429-33.
- Ansar M, Amin Ud Din M, Arshad M, Sohail M, Faiyaz-Ul-Haque M, Haque S, Ahmad W, Leal SM. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB35) maps to 14q24.1-14q24.3 in large consanguineous kindred from Pakistan. *Europ J Hum Genet* 2003; 11: 77-80.
- Ansar M, Ramzan M, Pham TL, Yan K, Jamal SM, Haque S, Ahmad W, Leal SM. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB38) to 6q26-q27 in a consanguineous kindred from Pakistan. *Hum Hered* 2003; 55(1):71-4.
- Ansar M, Chahrour MH, Amin Ud Din M, Arshad M, Haque S, Pham TL, Yan K, Ahmad W, Leal SM. DFNB44, a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus, maps to chromosome 7p14.1-q11.22. *Hum Hered.* 2004; 54(4):195-9.
- Appler JM, Goodrich LV. Connecting the ear to the brain: molecular mechanisms of auditory circuit assembly. *Prog Neurobiol* 2011.
- Aslam M, Wajid M, Chahrour MH, Ansar M, Haque S, Pham TL, Santos RP, Yan K, Ahmad W, Leal SM. A novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus (DFNB42) maps to chromosome 3q13.31-q22.3. *Am J Med Genet* 2005; 133A: 18-22.
- Atkinson PJ, Huarcaya NE, Sayyid AN, Cheng AG. Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. *Development* 2015; 142(9):1561-71.
- Baker S, Booth C, Fillman C, Shapiro M, Blair MP, Hyland JC, Ala-Kokko L. A Loss of Function Mutation in the *COL9A2* Gene Cause Autosomal Recessive Stickler Syndrome. *Am J Med Gen* 2011; 155:1668-1672.
- Baldwin CT, Weiss S, Farrer L, De Stefano A, Adair R, Franklyn B, Kidd KK, Korostishevsky M, Bonne-Tamir B. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 1637-1642.

- Bespalova IN et al. Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet.* 2001 Oct 15; 10(22):2501-8.
- Bhatti A, Lee K, McDonald ML, Hassan MJ, Gutala R, Ansar M, Ahmad W, Leal SM. Mapping of a new autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB45) to chromosome 1q43-q44. *Clin Genet* 2008; 73(4):395-8.
- Blanton SH. Et al. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness (DFNA41) maps to chromosome 12q24-qter. *J Med Genet.* 2002; 39(8):567-70.
- Bom SJ, Kunst HP, Huygen PL, Cremers FP, Cremers CW. Non-syndromal autosomal dominant hearing impairment: ongoing phenotypical characterization of genotypes. *Br J Audiol.* 1999; 33(5): 335-48.
- Bönsch D. et al. A novel locus for autosomal dominant, non-syndromic hearing impairment (DFNA18) maps to chromosome 3q22 immediately adjacent to the DM2 locus. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9(3):165-70.
- Bönsch D. et al. A new locus for an autosomal dominant, non-syndromic hearing impairment (DFNA57) located on chromosome 19p13.2 and overlapping with DFNB15.HNO. 2008; 56(2):177-82.
- Bönsch D et al. A new gene locus for an autosomal-dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA 33) is situated on chromosome 13q34-qter. *HNO.* 2009; 57(4):371-6.
- Bork JM, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailpathy CRS, Wayne S, Bellman S, and 16 others. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 26-37.
- Borck G, Ur Rehman A, Lee K, Pogoda HM, Kakar N, von Ameln S, Grillet N, Hildebrand MS, Ahmed ZM, Nurnberg G, Ansar M, Basit S, and 30 others. Loss-of-function

- mutations of ILDR1 cause autosomal-recessive hearing impairment DFNB42. *Am. J. Hum. Genet* 2011; 88: 127-137.
- Brophy PD, Alasti F, Dabro BW, Clarke J, Nishimura C, Cobb B, Smith RJ, Manak JR. Genomic-wide copy number variation analysis of a Branchio-oto-renal syndrome cohort identifies a recombination hotspot and implicates new candidate genes. *Hum Genet* 2013; 132 (12):1339-50.
- Brown MR. et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA13, maps to chromosome 6p. *Am J Hum Genet*. 1997; 61(4):924-927.
- Brownstein Z, Friedman LM, Shahin H, Oron-Karni V, Kol Nitzan, Abu Rayyan A, Parzefall T, Lev D, Shalev S, Frydman M, Davidov B, Shohat M, Rahile M, Lieberman S, Levy-Lahad E, Lee MK, Shomron M, King MC, Walsh T, Kanaan M, Avraham KB. Target genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families. *Genome Biology* 2011; 12R89.
- Brownstein Z, Abu-Rayyan A, Karfunkel-Doron D, Sirigu S, Davidov B, Shohat M, Fryman M, Houdusse A, Kanaan M, Avraham KB. Novel myosin mutations for hereditary hearing loss revealed by target genomic capture and massively parallel sequencing. *Eur J Hum Genet* 2014;22:768-775.
- Campbell DA, McHale DP, Brown KA, Moynihan LM, Houseman M, Karbani G, Parry G, Janjva AH, Newton V, al-Gazali L, Markham AF, Lench NJ, Mueller RF. A new locus for non-syndromal, autosomal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22. *J Med Genet* 1997; 34: 1015-1017.
- Catelani et al. Chromosome imbalances in syndromic hearing loss. *Clin Genet*. 2009; 76(5):458-64.
- Carter EM, Raggio CL. Genetic and ortopedic aspects of collagen disorders. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21:46-54.
- Chai Y, Chen D, Wang X, Wu H, Yang T. A novel splice site mutation in DFNA5 causes late-onset progressive nonsyndromic hearing loss in a Chinese family. *Int J Pediatr Otorhinolaringol* 2014; 78(8): 1265-8.

- Chaïb H. et al. A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. *Hum Mol Genet.* 1994; 3(12):2219-22.
- Chaïb H, Place C, Salem N, Chardenoux S, Vincent C, Weissenbach J, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum Molec Genet* 1996; 5: 155-158.
- Chaïb H, Place C, Salem N, Dode C, Chardenoux S, Weissenbach J, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. Mapping of DFNB12, a gene for a non-syndromal autosomal recessive deafness, to chromosome 10q21-22. *Hum Molec Genet* 1996; 5:1061-1064.
- Chan D, Cole WG. Low Basal Transcription of Genes for Tissue-specific Collagens by Fibroblasts and Lymphoblastoid Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 226(19):12487-12494.
- Chang EH, Menezes M, Meyer NC, Cucci RA, Veervoort VS, Schwartz CE, Smith RJH. Branchio-oto-renal syndrome: The mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences. *Hum Mut* 2004; 23:582-589.
- Chang MY, Choi BY. Strategy for the customized mass screening of genetic sensorineural hearing loss in Koreans. *Korean J Audiol* 2014; 18(2):45-49.
- Charizopoulou N, Lelli A, Schraders M, Ray K, Hildebrand MS, Ramesh A, Srisailapathy CR, Oostrik J, Admiraal RJC, Neely HR, Latoche JR, Smith RJH, Northup JK, Kremer H, Holt JR, Noben-Trauth K. Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nature Commun* 2011; 2: 201.
- Chatterjee A. et al. A novel locus DFNA59 for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps at chromosome 11p14.2-q12.3. *Hum Genet.* 2009; 124(6):669-75.
- Chen A, Francis M, Ni L, Cremers CW, Kimberling WJ, Sato Y, Phelps PD, Bellman SC, Wanger MJ, Pembrey M, Smith RJH Phenotypic manifestations of branchio-oto-renal syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 58:365-370.
- Chen A, Wayne S, Bell A, Ramesh A, Srisailapathy CR, Scott DA, Sheffield VC, Van Hauwe P, Zbar RI, Ashley J, Lovett M, Van Camp G, Smith RJ. New gene for

- autosomal recessive non-syndromic hearing loss maps to either chromosome 3q or 19p. *Am J Med Genet* 1997; 71(4):467-71.
- Chen W, Kahrizi K, Meyer NC, Riazalhosseini Y, Van Camp G, Najmabadi H, Smith RJH. Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J. Med. Genet* 2005; 42.
- Chen AH et al. Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Hum Mol Genet* 1995 Jun; 4(6):1073-6.
- Cheng J. et al. Functional mutation of SMAC/DIABLO, encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. *Am J Hum Genet.* 2011 Jul 15; 89(1):56-66.
- Chishti MS, Lee K, McDonald ML, Hassan MJ, Ansar M, Ahmad W, Leal SM. Novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB71) maps to chromosome 8p22-21.3. *J Hum Genet* 2009; 54(3):141-4.
- Collin RWJ, Kalay E, Tariq M, Peters T, van der Zwaag B, Venselaar H, Oostrik J, Lee K, Ahmed ZM, Caylan R, Li Y, Spierenburg HA, and 17 others. Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *Am. J. Hum. Genet* 2008; 82: 125-138.
- Coucke P. et al. Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families. *N. Engl. J. Med.* 1994 Aug 18; 331(7):425-31.
- Cox KH, Pinchak AB, Cooper AT. Genome-wide transcriptional analysis in *S.Cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast* 1999; 15:703-715.
- Craig DW. et al. Identification of genomic variants using bar-coded multiplexed sequencing. *Nat Methods* 2008 Oct; 5 (10): 887-896.
- Cryns K, Pfister M, Pennings RJ, Bom SJ, Flothmann K, Caethoben G, Kremer H, Schattemann I, Köln KA, Töth T, Kupka S, Blin N, Nürnberg P, Thiele H, van de Heyning PH, Reardon W, Stephens D, Cremers CW, Smith RJ, Van Camp G. Mutations in the WFS1 gene that cause low-frequency sensorineural are small non-inactivating mutations. *Hum Genet* 2002; 110(5):389-94.

- D'Adamo P. et al. A new locus (DFNA47) for autosomal dominant non-syndromic inherited hearing loss maps to 9p21-22 in a large Italian family. *Eur J Hum Genet.* 2003 Feb; 11(2):121-4.
- D'Adamo P. et al. A novel autosomal dominant non-syndromic deafness locus (DFNA48) maps to 12q13-q14 in a large Italian family. *Hum Genet.* 2003 Mar; 112(3):319-20.
- De Beeck KO, Van Laer L, Van Camp G. DFNA5, a gene involved in hearing loss and cancer: a review. *Ann Otol Rhinol Laringol* 2012; 121(3): 197-207.
- De Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, Huber I, Monaco AP, Malcolm S, Pembrey ME, Ropers HH, Cremers FP. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 1995; 267(5198):685-8.
- De Wan AT et al. A second kindred linked to DFNA20 (17q25.3) reduces the genetic interval. *Clin Genet.* 2003 Jan; 63(1):39-45.
- Del Castillo I, Villamar M, Surday M, Romero L, Herraiz C, Hernandez FJ, Rodriguez M, Borrás I, Montero A, Bellón J, Tapia MC, Moreno F. A novel locus for nonsyndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum Mol Genet* 1996; 5(9):1383-7.
- Delmaghani S, Aghaie A, Compain-Nouaille S, Ataie A, Lemaingue A, Zeinali S, Lathrop M, Weil D, Petit C. DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(10):816-8.
- Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, Van Laer L, Ben-Tal N, Van Camp G, Weil D, Langa F, Lathrop M, Avan P, Petit C. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nature Genet* 2006; 38: 770-778.
- Delmaghani S, Aghaie A, Michalski N, Bonnet C, Weil D, Petit C. Defect in the gene encoding the EAR/EPTP domain-containing protein TSPEAR causes DFNB98 profound deafness. *Hum Mol Genet* 2012; 21(17):3835-44.
- Denoyelle et al. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 1998 May 28; 393(6683):319-20.

- Dominguez LM, Dodson KM. Genetics of hearing loss: focus on DFNA2. *Appl Clin Genet*. 2012; 5:97-104.
- Donaudy F, Ferrara A, Esposito L, Hertzano R, Ben-David O, Bell RE, Melchiona S, Zelante L, Avraham KB, Gasparini P. Multiple mutations in MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1571-77.
- Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, Di Stazio M, Ferrara A, Lanzara C et al. Nonmuscle Myosin Heavy Chain MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet* 2004; 74:770-776.
- Egilmez OK, Kalcioglu MT. Genetics of nonsyndromic congenital hearing loss. *Scientifica*. 2016.
- Eisenberger T, Di Donato N, Baig SM, Neuhaus C, Beyer A, Decker E, Murbe D, Decker C, Bergmann C, Bolz HJ. Target and genomewide NGS data disqualify mutations in MYO1A, the DFNA48 gene as a cause of deafness. *Hum Mutat* 2014; 35(5):565-70.
- Ekdale EG. Form and function of the mammalian inner ear. *Journal of anatomy*. 2015; 228(2):324-337.
- Eyre DR. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4:30-35.
- Fagerheim T. et al. Identification of a new locus for autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA7) in a large Norwegian family. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(8):1187-91.
- Faletra F, D'Adamo AP, Bruno I, Athenasakis E, Biskup S, Esposito L, Gasparini P. Autosomal Recessive Stickler Syndrome Due to a Loss of Function Mutation in the *COL9A3* Gene. *Am J Med Genet* 2013; 164A:42-47.
- Faletra F, Girotto G, D'Adamo AP, Vozzi D, Morgan A, Gasparini P. A novel P2RX2 mutation in an Italian family affected by autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Gene* 2014 Jan 25; 534(2):236-9.
- Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2005 May; 69(5): 621-47.
- Flex E. et al. Mapping of a new autosomal dominant non-syndromic hearing loss locus (DFNA43) to chromosome 2p12. *J Med Genet*. 2003 Apr; 40(4):278-81.

- Fraser FC, Sproule JR, Halal F. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss. *Am J Med Genet* 1980; 7:341-349.
- Freitas EL, Oiticica J, Silva AG, Bittar RS, Rosenberg C, Mingroni-Netto RC. Deletion of the entire *POU4F3* gene in a familial case of autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *Eur J Med Genet* 2014; 57(4):125-8.
- Friedman LM, Dror AA, Avraham KB. Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol.* 2007; 51(6-7): 609-31.
- Friedman TB, Liang Y, Weber JL, Hinnant JT, Barber TD, Winata S, Arhya IN, Asher JH. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nature Genet* 1995; 9: 86-91.
- Friedman TB, Griffith AJ. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2003; 4: 341-402.
- Fukushima K, Ramesh A, Srisailapathy CR, Ni L, Chen A, O'Neil M, Van Camp G, Coucke P, Smith SD, Kenyon JB. Consanguineous nuclear families used to identify a new locus for recessive non-syndromic hearing loss on 14q. *Hum Mol Genet.* 1995. 4(9):1643-8.
- Fukushima, K., Ramesh, A., Srisailapathy, C. R. S., Ni, L., Wayne, S., O'Neill, M. E., Van Camp, G., Coucke, P., Jain, P., Wilcox, E. R., Smith, S. D., Kenyon, J. B., Zbar, R. I. S., Smith, R. J. H. An autosomal recessive nonsyndromic form of sensorineural hearing loss maps to 3p-DFNB6. *Genome Res.* 1995; 5: 305-308.
- Fukushima K. et al. A gene for fluctuating, progressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA16, maps to chromosome 2q23-24.3. *Am J Hum Genet.* 1999 Jul; 65(1):141-50.
- Gavara N, Manoussaki D, Chadwick RS. Auditory mechanisms of the tectorial membrane and the cochlear spiral. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 19(5):382-387.
- Goldstein JA, Lalwani AK. Further evidence for a third deafness gene within the DFNA2 locus. *Am J Med Genet.* 2002; 108 (4):304-9.

- Goutman JD, Elgohyen AB, Gomez-Casati ME. Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. FEBS.2015.
- Greene C.C. et al. DFNA25, a novel locus for dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment, maps to 12q21-24. *Am J Hum Genet.* 2001 Jan; 68(1):254-60.
- Greinwald JH, Wayne S, Chen AH, Scott DA, Zbar RI, Kraft ML, Prasad S, Ramesh A, Coucke P, Srisailapathy CR, Lovett M, Van Camp G, Smith RJ. Localization of a novel gene for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome region 7q31. *Am J Med Genet.* 1998; 78(2):107-13.
- Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Monica MD, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P. Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nature Genet* 1999; 23: 16-18.
- Grillet N, Schwander M, Hildebrand MS, Sczaniecka A, Kolatkar A, Velasco J, Webster JA, Kahrizi K, Najmabadi H, Kimberling WJ, Stephan D, Bahlo M, Wiltshire T, Tarantino LM, Kuhn P, Smith RJH, Muller U. Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 328-337.
- Guilford P, Ayadi H, Blanchard S, Chaib H, Le Paslier D, Weissenbach J, Drira M, Petit C. A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse sh-1 gene. *Hum Molec Genet* 1994; 3: 989-993.
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C. A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet* 1994; 6: 24-28.
- Guinan JJ, Salt A, Cheatham MA. Progress in cochlear physiology after Bekesy. *Hear Res* 2012; 293(1-2):12-20.
- Gürtler N et al. DFNA54, a third locus for low-frequency hearing loss. *J Mol Med (Berl).* 2004 Nov; 82(11):775-80.

- Häfner FM et al. A novel locus (DFNA24) for prelingual nonprogressive autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 4q35-qter in a large Swiss German kindred. *Am J Hum Genet.* 2000 Apr; 66(4):1437-42.
- Hassan MJ, Santos RL, Rafiq MA, Chahrour MH, Pham TL, Wajid M, Hijab N, Wambanqco M, Lee K, Ansar M, Yan K, Ahmad W, Leal SM. A novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB47) maps to chromosome 2p25.1-p24.3. *Hum Genet* 2006; 118(5):605-10.
- Hasson T. Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 2003; 116:3453-3461.
- Hildebrand MS, Morin M, Meyer NC, Mayo F, Modamio-Hoybjor S, Mencía A, Olavarrieta L et al. DFNA8/12 caused by TECTA mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Hum Mutat* 2011; 32(7):825-34.
- Hoornaert KP, Vereecke I, Dewinter C, Roseberg T et al. Stickler syndrome caused by *COL2A1* mutations: genotype-phenotype correlation in a series of 100 patients. *EJHG* 2010; 18:872-880.
- Hoppman N, Aypar U, Brodersen P, Brown N, Wilson J, Babovic-Vuksanovic D. Genetic testing for hearing loss in the United States should include deletion/duplication analysis for the deafness/infertility locus at 15q15.3. *Mol Cytogenet* 2013; 6(1):19.
- Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D, Zou D, Raymond RM, Orten DJ, Kimberling WJ, Smith RJ, Weil D, Petit C, Otto EA, Xu PX, Hildebrant F. Transcription factor *SIX5* is mutated in patients with Branchio-oto-renal syndrome. *Am J Hum Genet* 2007; 80:800-804.
- Hudspeth AJ. How the ear's works work. *Nature.* 1989 Oct 5; 341(6241):397-404.
- Irshad S, Santos RL, Muhammad D, Lee K, MsArthur N, Haque S, Ahmad W, Leal SM. Location of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB55 to chromosome 4q12-q13.2. *Clin Genet* 2005; 68(3):262-7.
- Isidor B, Pichon O, Redon R, Day-Salvatore D, Hamel A, Siwicka KA, Blitner-Glindzciz M, Heymann D, Kjellen L, Kraus C, Leroy JC, Mortier GR, Rauch A, Verloes A, David A, Le Caigneg C. Mesomelia Syntoses syndrome results from deletion of *SULF1* and *SLCO5A1* genes at 8q13. *Am J Hum Genet* 2010; 87(1):95-100.

- Jain PK, Fukushima K, Deshmukh D, Ramesh A, Thomas E, Lalwani AK, Kumar S, Ploplis B, Skarka H, Srisailapathy CRS, Wayne S, Zbar RIS, Verma IC, Smith RJH, Wilcox ER. A human recessive neurosensory nonsyndromic hearing impairment locus is a potential homologue of the murine deafness (dn) locus. *Hum Molec Genet* 1995; 4: 2391-2394.
- Jain PK, Lalwani AK, Li XC, Singleton TL, Smith TN, Chen A, Deshmukh D, Verma IC, Smith RJH, Wilcox ER. A gene for recessive nonsyndromic sensorineural deafness (DFNB18) maps to the chromosomal region 11p14-p15.1 containing the Usher syndrome type 1C gene. *Genomics* 1998; 50: 290-292.
- Kalatzis V, Petit C. The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet*. 1998; 7(10): 1589-97.
- Kelley MW. Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(11):837-49.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 1997; 387: 80-83.
- Kennedy HJ. New developments in understanding the mechanisms and function of spontaneous electrical activity in the developing mammalian auditory system. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2012; 13(4):437-445.
- Khan SY, Ahmed ZM, Shabbir MI, Kitajiri S, Kalsoom S, Tasneem S, Shayiq S, Ramesh A, Srisailapathy S, Khan SN, Smith RJH, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S. Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum. Mutat* 2007; 28: 417-423.
- Khan S, Chang R. Anatomy of the vestibular system: A review. *NeuroRehabilitation* 2013; 32(3):437-43.
- Kikkawa Y, Seki Y, Okumura K, Ohshiba Y, Miyasaka Y, Suzuki S, Ozaki M, Matsuoka K, Noguchi Y, Yonekawa H. Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp Anim*. 2012; 61(2):85-98.
- Kim HJ, Won HH, Park KJ, Hong SH, Ki CS, Cho SS, Venselaar H, Vried G, Kim JW. SNP linkage analysis and whole exome sequencing identify a novel POU4F3

- mutation in autosomal dominant late-onset nonsyndromic hearing loss (DFNA15). Plos One 2013; 8(11).
- Kochhar A, Orten DJ, Sorensen JL, Fischer FS, Cremers CW, Kimberling WJ, Smith RJ SIX1 mutation screening in 247 Branchio-oto-renal syndrome families: a recurrent missense mutation associated with BOR. Hum Mutat 2008; 29:565.
- Krug P, Moriniere V, Marlin S, Koubi V, Gabriel HD, Colin E, Bonneau D, Salomon R, Antignac C, Heidet L Mutation screening of the *EYAI*, *SIX1* and *SIX5* genes in a large cohort of patients harbouring Branchio-oto-renal syndrome calls into question the pathogenic role of *SIX5* mutations. Hum Mutat 2011; 32:183-190.
- Kubisch, C., Schroeder, B. C., Friedrich, T., Lutjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., Jentsch, T. J. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. Cell 1999 Feb; 96(3): 437-446.
- Kurima K, Szymko Y, Rudy S, et al. Genetic map localization of DFNA34 and DFNA36, two autosomal dominant nonsyndromic deafness loci. American Society of Human Genetics; Philadelphia, PA: 2000.
- Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, Arnaud D, Drury S, Mo J, Makishima T, Ghosh M, Menon PSN, and 13 others. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, *TMC1*, required for cochlear hair-cell function. Nature Genet 2002; 30: 277-284.
- Lalwani AK, Brister JR, Fex J, Grundfast KM, Pikus AT, Ploplis B, San Agustin T, Skarka H, Wilcox ER. A new nonsyndromic X-linked sensorineural hearing impairment linked to Xp21.2. Am J Hum Genet. 1994; 55(4):685-94.
- Lalwani AK et al. A new locus for nonsyndromic hereditary hearing impairment, DFNA17, maps to chromosome 22 and represents a gene for cochleosaccular degeneration. (Letter) Am. J. Hum. Genet. 1999; 64: 318-323.
- Lalwani AK et al. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. Am J Hum Genet. 2000 Nov; 67(5):1121-8.

- Lander ES et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb 15; 409(6822):860-921.
- León PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King MC. The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Nat Acad Sci.* 1992; 89: 5181-5184.
- Lesperance MM et al. A gene for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment maps to 4p16.3. *Hum Mol Genet.* 1995 Oct; 4(10):1967-72.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. (Letter) *Nature Genet* 1998; 18: 215-217.
- Lin X. et al. Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities. *Hear. Res.* 2012 Jun; 288 (1-2): 67-76.
- Liu F, Hu J, Xia W, Hao L, Ma J, Ma D, Ma Z. Exome sequencing identifies a mutation in *EYA4* as a novel cause of autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *PLoS One* 2015; 10(5).
- Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, Zheng J, Pandya A, Li F, Du LL, Welch KO, Petit C, Smith RJH, Webb BT, Yan D, Arnos KS, Corey D, Dallos P, Nance WE, Chen ZY. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Hum. Molec Genet* 2003; 12: 1155-1162.
- Liu X, Han D, Li J, Han B, Ouyang X, Cheng J, Li X, Jin Z, Wang Y, Bitner-Glindzicz M. Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *Am J Hum Genet.* 2010; 86(1):65-71.
- Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ. Mutations in the myosine VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1997; 16:188-190.
- Liu XZ, Walsh J, Tamagawa Y, Kitamura K, Nishizawa M. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat Genet* 1997; 17:268-269.
- Lynch ED et al. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. *Science* 1997 Nov 14; 278 (5341):1315-8.

- Lyndroos K, Sigurdsson S, Johansson K, Ronnblom L, Syvanen AC. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-color microarray system. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(14).
- Mangino M et al. Mapping of a new autosomal dominant nonsyndromic hearing loss locus (DFNA30) to chromosome 15q25-26. *Eur J Hum Genet*. 2001 Sep; 9(9):667-71.
- Manolis EM et al. A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Hum Mol Genet*. 1996 Jul; 5(7):1047-50.
- Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet*. 1993 Jun 15; 46(5): 486-91.
- Masmoudi S, Tlili A, Majava M, Ghorbel AM, Chardenoux S, Lemainque A, Zina ZB, Moala J, Mannikko M, Weil D, Lathrop M, Ala-Kokko L, Drira M, Petit C, Ayadi H. Mapping of a new autosomal recessive nonsyndromic hearing loss locus (DFNB32) to chromosome 1p13.3-22.1. *Europ. J. Hum. Genet* 2003; 11: 185-188.
- Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *PNAS* 1977 Feb; 74(2):560-4.
- Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, Holme RH, Rump A, Hardisty RE, Blanchard S, Coimbra RS, Perfettini I, Parkinson N, and 12 others. Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nature Genet* 2003; 34: 421-428.
- McGuirt WT. et al. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat Genet*. 1999 Dec; 23(4):413-9.
- Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E, Weil D, Parronau J, Salem N, Delaque V, Loiselet J, Lathrop M, Petit C, Megarbané A. Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(6):391-4.

- Melchionda S et al. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet.* 2001 Sep; 69(3):635-40.
- Mencía A, González-Nieto D, Modamio-Hoybjor S, Etxeberria A, Aránguez G, Salvador N, del Castillo I, Villaroel A, Moreno F, Barrio L, Moreno-Pelayo MA. A novel KCNQ4 pore-region mutation (p.G296S) causes deafness by impairing cell-surface channel expression. *Hum Genet* 2008; 123:41-53.
- Mencía A. et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet.* 2009 May; 41(5):609-13.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11; 16(3): 1215.
- Mingroni Netto RC, Tiaki Uehara DT, Lopes Freitas EL, Forte Mazzeu J, Mello Auricchio MT, Tabith A, Rosenberg C. A duplication in a patient with nonsyndromic deafness reveals a novel candidate gene for deafness, *DOCK4*. 8th molecular biology of hearing and deafness conference. 6-9 July 2011.
- Mir A, Ansar M, Chahrour MH, Pham TL, Wajid M, Haque S, Yan K, Ahmad W, Leal SM. Mapping of a novel autosomal recessive nonsyndromic deafness locus (DFNB46) to chromosome 18p11.32-p11.31. *Am J Med Genet A.* 2005; 133A(1):23-6.
- Mirghomizadeh F. et al. Second family with hearing impairment linked to 19q13 and refined DFNA4 localisation. *Eur J Hum Genet* 2002 Feb; 10(2):95-9.
- Miyagawa M, Naito T, Nishio S, Kamatani N, Usami S. Target exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients. *Plos* 2013 Aug 13; 8(8).
- Modamio-Hoybjor S. et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA44) maps to chromosome 3q28-29. *Hum. Genet.* 2003 Jan; 112(1): 24-28.

- Modamio-Hoybjor S. et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA50, maps to chromosome 7q32 between the DFNB17 and DFNB13 deafness loci. *J Med Genet.* 2004 Feb; 41(2):e14.
- Modamio-Hoybjor S. et al. A mutation in CCDC50, a gene encoding an effector of epidermal growth factor-mediated cell signaling, causes progressive hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 2007 Jun; 80(6): 1076-1089.
- Morell RJ. et al. A new locus for late-onset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25. *Genomics.* 2000 Jan 1; 63(1):1-6.
- Moreno-Pelayo MA, del Castillo I, Villamar M, Romero L, Hernandez-Calvin FJ, Herrainz C, Barbera R, Navas C, Moreno F. A cysteine substitution in the zona pellucida domain of alpha-tectorin results in autosomal dominant, postlingual, progressive, mid frequency hearing loss in a Spanish family. *J Med Genet* 2001; 38:E13.
- Moreno-Pelayo MA et al. DFNA49, a novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, maps proximal to DFNA7/DFNM1 region on chromosome 1q21-q23. *J Med Genet.* 2003 Nov; 40(11):832-6.
- Morin M, Bryan KE, Mayo-Merino F, Goodyear R, Mencía A, Modamio-Hoybjor S, del Castillo I, Cabalka JM, Richardson G, Moreno F, Rubenstein PA, Moreno-Pelayo MA. In vivo and in vitro effects of two novel gamma-actin (ACTG1) mutations that cause DFNA20/26 hearing impairment. *Hum Mol Genet* 2009; 18(16):3075-89.
- Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 630: 16-31.
- Morton CC. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet.* 2002 May 15; 11(10): 1229-40.
- Moynihan L, Houseman M, Newton V, Mueller R, Lench N. DFNB20: a novel locus for autosomal recessive, non-syndromal sensorineural hearing loss maps to chromosome 11q25-qter. *Eur J Hum Genet.* 1999; 7(2):243-6.
- Musharraf A, Kruspe D, Tomasch J, Besenbeck B, Englert C, Landgraf K. BOR-syndrome associated Eya1 mutations lead to enhanced proteasomal degradation of EYA1 protein. *PLoS One* 2014; 9(1).

- Mustapha M, Chardenoux S, Nieder A, Salem N, Weissenbach J, el-Zir E, Loiselet J, Petit C. A sensorineural progressive autosomal recessive form of isolated deafness, DFNB13, maps to chromosome 7q34-q36. *Eur J Hum Genet* 1998; 6(3):245-50.
- Mustapha M, Salem N, Weil D, el-Zir E, Loiselet J, Petit C. Identification of a locus on chromosome 7q31, DFNB14, responsible for prelingual sensorineural non-syndromic deafness. *Eur J Hum Genet*. 1998; 6(6):548-51.
- Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S, El-Zir E, Beckmann JS, Loiselet J, Petit C. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum. Molec. Genet* 1999; 8: 409-412.
- Mustapha M, Chouery E, Chardenoux S, Naboulsi M, Paronnaud J, Lemainque A, Megarbane A, Loiselet J, Weil D, Lathrop M, Petit C. DFNB31, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 9q32-34. *Europ. J. Hum. Genet* 2002; 10: 210-212.
- Myllyharju J, Kivirikko K. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 2001; 33:7-21.
- Naz S, Giguere CM, Kohrman DC, Mitchem KL, Riazuddin S, Morell RJ, Ramesh A, Srisailpathy S, Deshmukh D, Riazuddin S, Griffith AJ, Friedman TB, Smith RJH, Wilcox ER. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am. J. Hum. Genet* 2002; 71: 632-636.
- Naz S, Griffith AJ, Riazuddin S, Hampton LL, Battey JF Jr, Khan SN, Riazuddin S, Wilcox ER, Friedman TB. Mutations of ESPN cause autosomal recessive deafness and vestibular dysfunction. *J. Med. Genet* 2004; 41: 591-595.
- Nikopoulos K, Schrauwen I, Simon M, Collin RWJ, Veckeneer M, Keymolen K, Van Camp G, Cremers FPM, van der Born I. Autosomal Recessive Stickler Syndrome in Two Families Is Caused by Mutations in the *COL9A1* Gene. *IOVS* 2011; 52(7):4474-4479.
- Olavarrieta L, Morales-Angulo C, del Castillo I, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. Stickler and branchio-oto-renal syndromes in a patient with mutations in *EYA1* and *COL2A1* genes. *Clin Genet* 2008; 73:262-267.

- O'Neill ME et al. A gene for autosomal dominant late-onset progressive non-syndromic hearing loss, DFNA10, maps to chromosome 6. *Hum Mol Genet.* 1996 Jun; 5(6):853-6.
- Oonk AM, Leijendeckers JM, Lammers EM, Weegerink NJ, Oostrik J, Beynon AJ, Huygen PL, Kunst HP, Kremer H, Snif AF, Pennings RJ. Progressive hereditary hearing impairment caused by MYO6 mutation resembles presbycusis. *Hear Res.* 2013 May; 299:88-98.
- Orten DJ, Fischer SM, Sorensen JL, Radhakrishna U, Cremers CW, Marres HA, Van Camp G, Welch KO, Smith RJ, Kimberling WJ. Branchio-Oto-Renal syndrome (BOR): Novel mutations in the EYA1 gene, and a review of the mutational genetics of BOR. *Hum Mutat* 2008; 29(4):537-44.
- Oshima A et al. CRYM mutations cause deafness through thyroid hormone binding properties in the fibrocytes of the cochlea. *J Med Genet.* 2006 Jun; 43(6):e25.
- Ospeck M, Dong XX, Fang J, Iwasa KH Electromotility in outer hair cells: a supporting role for fast potassium conductance. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006; 68(6): 373-7.
- Ouyang XM, Xia XJ, Verpy E, Du LL, Pandya A, Petit C, Balkany T, Nance WE, Liu XZ. Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. *Hum. Genet* 2002; 111: 26-30.
- Patrick AN, Cabrera JH, Smith AL, Chen XS, Ford HL, Zhao R. Structure-function analyses of the human SIX1-EYA2 complex reveal insights into metastasis and BOR syndrome. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(4):447-453.
- Peters LM et al. Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum Mol Genet.* 2002 Nov 1; 11(23):2877-85.
- Petersen MB. Non-syndromic autosomal-dominant deafness. *Clin Genet.* 2002 Jul; 62(1): 1-13.
- Petit C. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet.* 1996 Dec; 14(4): 385-91.

- Petit C, Levilliers J, Hardelin JP. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet.* 2001; 35: 589-646.
- Platinga RF, de Brouwer AP, Huygen PL, Kunst HP, Kremer H, Cremers CW. A novel TECTE mutation in a Dutch DFNA8/12 family confirms genotype-phenotype correlation. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2006; 7:173-181.
- Probst FJ, Camper SA. The role of mouse mutants in the identification of human hereditary hearing loss genes. *Hearing Research* 1999;130: 1-6.
- Pulley LJ, Jackson AP, Roberts E, Carridice A, Muxworthy C, Houseman M, Al-Gazali LI, Lench NJ, Markham AF, Mueller RF. A new locus for autosomal recessive non-syndromal sensorineural hearing impairment (DFNB27) on chromosome 2q23-q31. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8(12):991-3.
- Ramzan K, Shaikh RS, Ahmad J, Khan SN, Riazuddin S, Ahmed ZM, Friedman TB, Wilcox ER, Riazuddin S. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1. *Hum. Genet* 2005; 116: 17-22.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comp Biol* 1997; 4(3):311-23.
- Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. 2002; *Arthritis Res* 4: 337-345.
- Rehman AU, Morell RJ, Belyantseva IA, Khan SY, Boger ET, Shahzad M, Ahmed ZM, Riazuddin S, Khan SN, Riazuddin S, Friedman TB. Targeted capture and next-generation sequencing identifies C9orf75, encoding taperin, as the mutated gene in nonsyndromic deafness DFNB79. *Am. J. Hum. Genet* 2010; 86: 378-388.
- Rehman AU, Gul K, Morell RJ, Lee K, Ahmed ZM, Riazuddin S, Ali RA, Shahzad M, Jaleel A, Andrade PB, Khan SN, Khan S, Brewer CC, Ahmad W, Leal SM, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations of GIPC3 cause nonsyndromic hearing loss DFNB72 but not DFNB81 that also maps to chromosome 19p. *Hum. Genet* 2011; 130: 759-765.
- Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, Lalwani AK, Matroiani MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ, Riazuddin S, Wilcox ER. Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet* 2000; 26(4):431-4.

- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am. J. Hum. Genet* 2003; 79: 1040-1051.
- Riazuddin S, Khan SN, Ahmed ZM, Ghosh M, Caution K, Nazli S, Kabra M, Zafar AU, Chen K, Naz S, Antonelli A, Pavan WJ, Green ED, Wilcox ER, Friedman PL, Morell RJ, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet.*2006; 78:137-142.
- Riazuddin S, Anwar S, Fischer M, Ahmed ZM, Khan SY, Janssen AGH, Zafar AU, Scholl U, Husnain T, Belyantseva IA, Friedman PL, Riazuddin S, Friedman TB, Fahlke C. Molecular basis of DFNB73: mutations of BSND can cause nonsyndromic deafness or Bartter syndrome. *Am. J. Hum. Genet* 2009; 85: 273-280.
- Richards AJ, Laidlaw M, Whittaker J, Treacy B, Rai H, Bearcroft P, Baguley DM, Poulson A, Ang A, Scott JD, Snead MP. High efficiency of mutation detection in type 1 stickler syndrome using a two-stage approach: vitreoretinal assessment coupled with exon sequencing for screening COL2A1. *Hum Mutat* 2006; 27: 696-704.
- Richards AJ, McNinch A, Martin H, Oakhill K, Rai H, Waller S, Treacy B, Whittaker J, Meredith S, Poulson A, Snead MP. Stickler Syndrome and the Vitreous Phenotype: Mutations in COL2A1 and COL11A1. *Human Mutation* 2010; E1461-E1471.
- Richard S, Boxer M, Trompeter R, Blitner-Glindzicz M. Importance of clinical evaluation and molecular testing in the branchio-oto-renal (BOR) syndrome and overlapping phenotypes. *J Med Genet* 2000; 37:623-627.
- Rickard S, Parker M, Hoff WV, Barnicoat A, Russell-Eggitt I, Winter RM, Bitner-Glindzicz M. Oto-facio-cervical (OFC) syndrome is a contiguous gene deletion syndrome involving EYA1: molecular analysis confirms allelism with BOR syndrome and further narrows the Duane syndrome critical region to 1cM. *Hum Genet* 2001; 108:398-403.

- Robertson NG et al. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet.* 1998 Nov; 20(3):299-303.
- Robin NH, Morat RT, Warman M, Ala-Kokko L. Stickler syndrome. *GeneReviews* (Internet). Edited by Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, et al. Seattle: University of Washington; 1993 Jun 9 (Updated 2011 Nov 3).
- Rose PS, Levy HP. Stickler syndrome: Clinical Characteristics and Diagnostic Criteria. *AJMG* 2005; 138A: 199-207.
- Rosenberg C, Freitas EL, Uehara DT, Auricchio MT, Costa SS, Oiticica J, Silva AG, Krepischi AC, Mingronni-Netto RC. Genomic Copy Number alterations in nonsyndromic hearing loss. *Clin Genet* 2015.
- Ruel J. et al. Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet.* 2008 Aug; 83(2):278-92.
- Sagong B, Park R, Kim YH, Lee KY, Baek JI, Cho HJ, Cho IJ, Kim UK, Lee SH. Two novel missense mutations in the TECTA gene in Korean families with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Ann Clin Lab Sci.* 2010 Fall; 40(4):380-5.
- Sakaguchi A, Tokita J, Müller U, Kachar B. Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 17(5):388-393.
- Salam AA et al. A novel locus (DFNA23) for prelingual autosomal dominant nonsyndromic hearing loss maps to 14q21-q22 in a Swiss German kindred. *Am J Hum Genet.* 2000 Jun; 66(6):1984-8.
- Sánchez-Valle A. et al. HERV-mediated genomic rearrangement of EYA1 in an individual with branchio-oto-renal syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010 Nov; 152A(11):2854-60.

- Santos RL, Hassan MJ, Sikandar S, Lee K, Ali G, Martin PE Jr, Wambanqco MA, Ahmad W, Leal SM. DFNB68, a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus at chromosomal región 19p13.2. *Hum Genet* 2006; 120(1):85-92.
- Sang Q, Yan X, Wang H, Feng R, Fei X, Ma D, Xing Q, Li Q, Zhao X, Jin L, He L, Li H, Wang L. Identification and functional study of a new missense mutation in the motor head domain of myosin VIIA in a family with autosomal dominant hearing impairment (DFNA11) *PloS ONE* 2013; 8(1).
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 1977 Dic; v74 (12)5463-7.
- Sanggaard KM, Kjaer KW, Eiberg H, Nürnberg G, Nürnberg P, Hoffman K, Hensen H, Sorum C, Rendtorff ND, Tranebjaerg L. A novel nonsense mutation in MYO6 is associated with progressive nonsyndromic hearing loss in a Danish DFNA22 family. *Am J Med Genet A*. 2008 Apr 15; 146A(8):1017-25.
- Schraders M, Lee K, Oostrik J, Huygen PLM, Ali G, Hoefsloot LH, Veltman JA, Cremers FPM, Basit S, Ansar M, Cremers CWRJ, Kunst HPM, Ahmad W, Admiraal RJC, Leal SM, Kremer H. Homozygosity mapping reveals mutations of GRXCR1 as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet* 2010; 86: 138-147.
- Schraders M, Oostrik J, Huygen PLM, Strom TM, van Wijk E, Kunst HPM, Hoefsloot LH, Cremers CWRJ, Admiraal RJC, Kremer H. Mutations in PTPRQ are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction. *Am. J. Hum. Genet* 2010; 86: 604-610.
- Schraders M, Ruiz-Palmero L, Kalay E, Oostrik J, DEL Castillo FJ, Sezgin O, Beynon AJ, Strom TM, Pennings RJ, Seco CZ, Oonk AM, Kunst HP, Dominguez-Ruiz M, Garcia-Urami AM, del Campo M, Villamar M, Hoefsloot LH, Moreno F, Admiraal RJ, del Castillo I, Kremer H. Mutations of the gene encoding otogelin are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. *Am J Hum Genet*. 2012; 91(5):883-9.
- Schultz JM, Khan SN, Ahmed ZM, Riazuddin S, Waryah AM, Chhatre D, Starost MF, Ploplis B, Buckley S, Velásquez D, Kabra M, Lee K, Hassan MJ, Ali G, Ansar M,

- Ghosh M, Wilcox ER, Ahmad W, Merlino G, Leal SM, Riazuddin S, Friedman TB, Morell RJ. Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. *Am J Hum Genet* 2009;85(1):25-39.
- Scott HS, Kudoh J, Wattenhofer M, Shibuya K, Berry A, Chrast R, Guipponi M, Wang J, Kawasaki K, Asakawa S, Minoshima S, Younus F, and 10 others. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nature Genet* 2001; 27: 59-63.
- Shabbir MI, Ahmed ZM, Khan SY, Riazuddin S, Waryah AM, Khan SN, Camps RD, Ghosh M, Kabra M, Belvantseva IA, Friedman TB, Riazuddin S. Mutations of human TMHS cause recessively inherited nonsyndromic hearing loss. *J. Med. Genet* 2006; 43: 634-640.
- Shahin H, Walsh T, Sobe T, Sa'ed JA, Rayan AA, Lynch ED, Lee MK, Avraham KB, King MC, Kanaan M. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet* 2006; 78: 144-152.
- Shahin H, Walsh T, Rayyan AA, Lee MK, Higgins J, Dickel D, Lewis K, Thompson J, Baker C. Five novel loci inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families. *Europ J Hum Genet* 2010; 18:407-413.
- Shaikh RS, Ramzan K, Nazli S, Sattar S, Khan SN, Riazuddin S, Ahmed ZM, Friedman TB, Riazuddin S. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB51 maps to chromosome 11p13-p12. *Am J Med Genet A*. 2005; 138(4):392-5.
- Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola J, Scherer S, Scheetz TE, Smith RJH. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Sci.* 2010; 107(46):21104-21109.
- Shearer AE, Smith RJH. Genetics: advances in genetic testing for deafness. *Curr Opin Pediatr* 2012; 24(6):679-686.
- Shearer AE, Black-Ziegelbein EA, Hildebrand MS, Eppsteiner RW, Ravi H, Joshi S, Guiffre AC, Sloan CM, Happe S, Howard SD, Novak B, DeLuca AP, Taylor KR, Scheetz TE, Braun TA, Casavant TL, Kimberling WJ, LeProust EM, Smith RJH.

- Advancing genetic testing for deafness with genomic technology. *J Med Genet* 2013; 50 (9):627-34.
- Shendure J. and Ji H. Next generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 2008 Oct; 26 (10): 1135-45.
- Sirmaci A, Erbek S, Price J, Huang M, Duman D, Cengiz FB, Bademci G, Tokgoz-Yilmaz S, Hismi B, Ozdag H, Ozturk B, Kulaksizoglu S, and 13 others. A truncating mutation in SERPINB6 is associated with autosomal-recessive nonsyndromic sensorineural hearing loss. *Am. J. Hum. Genet* 2010; 86: 797-804.
- Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, Kolbe DL, Nishimura CJ, Frees KL, Ephraim SS, Shibata SB, Booth KT, Campbell CA, Ranum PT, Weaver AE, Black Ziegelbein EA, Wang D, Azaiez H, Smith RJH. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet* 2016; 135:441-450.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986 Jun 12-18; 321(6071):674-9.
- Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS, Van Camp G. Deafness and hereditary hearing loss overview. *Genereviews*. 1999 (updated 2014).
- Smith, RJH, VanCamp, G. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview (December 2, 2008). In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2009. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed, Dec.09.
- Snoeckx RL et al. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic hearing loss, DFNA31, maps to chromosome 6p21.3. *J Med Genet*. 2004 Jan; 41(1):11-3.
- Song ME, Kwon TJ, Kim HR, Jeon JH, Baek JI, Lee WS, Kim UK, Choi JY. Mutational analysis of EYA1, SIX1 and SIX5 genes and strategies for management of hearing loss in patients with BOR/BO syndrome. *PLoS One* 2013; 8(6).
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separates by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975 Nov5; 98 (3):503-17.

- Stickler GB, Belau PG, Farrel FJ, Jones JD, Pugh DJ, Steinberg AJ. Hereditary progressive arthro-ophthalmopathy. *Mayo Clin Proc.* 1965; 40:433-455.
- Stockley TL, Mendoza-Londono R, Propst EJ, Sodhi S, Dupuis L, Papsin BC. A recurrent EYA1 mutation causing alternative RNA splicing in branchio-oto-renal syndrome: implications for molecular diagnostics and disease mechanism. *Am J Hum Genet* 2009; 149A:322-327.
- Sun Y, Cheng J, Lu Y, Li J, Lu Y, Jin Z, Dai P, Wang R, Yuan H. Identification of two novel missense WFS1 mutations, H696I and R703H, in patients with non-syndromic low-frequency sensorineural hearing loss. *J Genet Genomics.* 2011 Feb; 38(2):71-6.
- Sun Y, Zhang Z, Cheng J, Lu Y, Yan CL, Luo YY, Yang G, Yang H, Zhu L, Zhou J, Yao HQ. A novel mutation of EYA4 in a large Chinese family with autosomal dominant middle-frequency sensorineural hearing loss by targeted exome sequencing. *J Hum Genet* 2015; 60(6):299-304.
- Tabatabaiefar MA, Alasti F, Shariati L, Farrokhi E, Fransen E, Nooridalooi MR, Chaleshtori MH, Van Camp G. DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. *Clin Genet* 2011; 79(6):594-8.
- Tamagawa Y. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Hum Mol Genet* 1996 Jun; 5(6):849-52.
- Tamagawa Y, Ishikawa K, Ishikawa K, Ishida T, Kitamura K, Makino S, Tsuru T, Ichimura K. Phenotype of DFNA11: a nonsyndromic hearing loss caused by a myosin VIIA mutation. *Laryngoscope* 2002; 112(2):292-7.
- Tan M, Shen X, Yao J, Wei Q, Lu Y, Cao X, Xing G. Identification of I411K, a novel missense EYA4 mutation causing autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *Int J Mol Med* 2014 Dec; 34(6): 1467-72.
- Tariq A, Santos RLP, Khan MN, Lee K, Hassan MJ, Ahmad W, Leal SM. Localization of the novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus DFNB65 to chromosome 20q13.2-q13.32. *J. Molec. Med* 2006; 85: 484-490.

- Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet*. 2001 Sep 29; 358(9287): 1082-90.
- Tlili A, Mannikko M, Charfedine I, Lahmar I, Benzina Z, Ben Amor M, Driss N, Ala-Kokko L, Drira M, Masmoudi S, Ayadi H. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus, DFNB66, maps to chromosome 6p21.2-22.3 in a large Tunisian consanguineous family. *Hum. Hered* 2005; 60: 123-128.
- Tlili A, Masmoudi S, Dhouib H, Bouaziz S, Rebeh IB, Chouchen J, Turki K, Benzina Z, Charfedine I, Drira M, Ayadi H. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB63 to chromosome 11q13.3-q13.4. *Ann. Hum. Genet* 2006; 71: 271-275.
- Vahava O. et al. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science*. 1998 Mar 20; 279(5358):1950-4.
- Van Camp et al. Localization of a gene for non-syndromic hearing loss (DFNA5) to chromosome 7p15. *Hum Mol Genet* 1995 Nov; 4(11):2159-63.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. URL: <http://hereditaryhearingloss.org/>
- Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, van den Ende J, Fukuoka H, Wagatsuma M, Suzuki H, Smets RME, Vanhoenacker F, Declau F, Van De Heyning P, Usami S. A New Autosomal Recessive Form of Stickler Syndrome Is Caused by a Mutation in the *COL9A1* Gene. *AJHG* 2006; 70: 449-457.
- Van Laer et al. Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet*. 1998 Oct; 20(2):194-7.
- Van Wijk E. et al. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *J Med Genet*. 2003 Dec; 40(12):879-84.
- Venter JC et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001 Feb 16; 291(5507):1304-51.

- Verhoeven K et al. A gene for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA12) maps to chromosome 11q22-24. *Am J Hum Genet* 1997 May; 60(5):1168-73.
- Verhoeven K et al. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat Genet.* 1998 May; 19(1):60-2.
- Verpy E, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovici M, Hutchin TP, Del Castillo I, Nouaille S, Blanchard S, Laine S, Popot JL, Moreno F, Mueller RF, Petit C. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nature Genet* 2001; 29: 345-349.
- Vervoort VS, Smith RJH, O'Brien J, Schroer R, Abbot A, Stevenson RE, Schwartz CE. Genomic rearrangements of *EYAI* account for a large fraction of families with BOR syndrome. *Eur J Hum Genet* 2002; 10:757-766.
- Veske A, Oehlmann R, Younus F, Mohyuddin A, Muller-Myhsok B, Mehdi SQ, Gal A. Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan. *Hum. Molec. Genet* 1996; 5: 165-168.
- Vona B, Nanda I, Hofrichter MAH, Shehata-Dieler W. Non-syndromic hearing loss gene identification: a brief history and glimpse into the future. *Mol Cell Probes* 2015;1-11.
- Vozzi D, Morgan A, Vuckovic D, D'Eustacchio A, Abdulhadi K, Rubinato E, Baddi R, Gasparini P, Girotto G. Hereditary hearing loss: a 96 gene target sequencing protocol reveals novel alleles in a series of Italian and Qatari patients. *Gene* 2014; 542(2): 209-16.
- Wajid M, Abbasi AA, Ansar M, Pham TL, Yan K, Haque S, Ahmad W, Leal SM. DFNB39, a recessive form of sensorineural hearing impairment, maps to chromosome 7q11.22-q21.12. *Europ. J. Hum. Genet* 2003; 11: 812-815.
- Wallis C, Ballo R, Wallis G, Beighton P, Goldblatt J. X-linked mixed deafness with stapes fixation in a mauritain kindred: linked to Xq probe pDP34. *Genomics* 1988; 3:299-301.

- Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H, Haika S, Lee MK, Kanaan M, King MC, Avraham KB. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Nat Acad Sci* 2002; 99: 7518-7523.
- Walsh T, Pierce SB, Lenz DR, Brostein Z, Dagan-Rosenfeld O, Shahin H, McCarthy S, Nord AS, Gordon CR, Ben-Neriah Z, Sebat J, Kanaan M, Lee MK, Frydman M, King MC, Avraham KB. . Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *Am J Hum Genet*. 2010 Jul 9; 87(1):101-9.
- Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, Lee MK, Thornton AM, Roeb W, Abu Rayyan A, Loulus S, Avraham KB, King MC, Kanaan M. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82. *Am. J. Hum. Genet* 2010; 87: 90-94.
- Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER, Touchman JW, Morton CC, Morell RJ, Noben-Trauth K, Camper SA, Friedman TB. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 1998; 280: 1447-1451.
- Wang QJ, Lu CY, Li N, Rao SQ, Shi YB, Han DY, Li X, Cao JY, Yu LM, Li QZ, Guan MX, Yang WY, Shen Y. Y-linked inheritance of non-syndromic hearing impairment in a large Chinese family. *J Med Genet*. 2004 Jun; 41(6).
- Wang QJ, Li QZ, Rao SQ, Lee K, Huang XS, Yang WY, Zhai SQ, Guo WW, Guo YF, Yu N, Zhao YL, Yuan H, Guan J, Leal SM, Han DY, Shen Y. AUNXQ, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3. *J Med Genet* 2006; 43(7).
- Wang Q, Xue Y, Zhang Y, Long Q, Asan, Yang F, Turner DJ, Fitzgerald T, Ling Ng B, Zhao Y, Chen Y, Liu Q, Yang W, Han D, Quail MA, Swerdlow H, Burton J, Fahey C, Ning Z, Hurles ME, Carter NP, Yang H, Tyler-Smith C. Genetic basis of Y-linked hearing impairment. *Am J Hum Genet* 2013; 92:301-306.
- Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol* 2006; 576:11-21.

- Waryah AM, Rehman A, Ahmed ZM, Bashir ZH, Khan SY, Zafar AU, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S. DFNB74, a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus on chromosome 12q14.2-q15. *Clin. Genet* 2009; 76: 270-275.
- Watson J.D. and Crick F.H.C. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953 April 25; 171:737-738.
- Wayne S. et al. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet.* 2001 Feb 1; 10(3):195-200.
- Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 1995; 374:60-61.
- Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nature Genet* 1997; 16: 191-193.
- Weston MD et al. MicroRNA-183 family expression in hair cell development and requirement of microRNAs for hair cell maintenance and survival. *Dev Dyn.* 2011 Apr; 240(4):808-19.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyatseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause recessive deafness DFNB29. *Cell* 2001; 104: 165-172.
- Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med.* 2000 Apr 13; 342(15): 1101-9.
- Xia, J. et al. Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nature Genet.* 1998 Dec; 20(4): 370-373.
- Xia J. et al. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss identified at 5q31.1-32 in a Chinese pedigree. *J Hum Genet.* 2002; 47(12):635-40.
- Xiao S. et al. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet.* 2001 Feb; 27(2):201-4.
- Yalan L, Hua Z, Yong F. Progress in the study of syndromic hearing loss resulted from neural crest abnormalities. *Yi Chuan* 2014; 36(11): 1131-44.

- Yan D. et al. A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness, DFNA53, maps to chromosome 14q11.2-q12. *J Med Genet*. 2006 Feb; 43(2):170-4.
- Yang T, Pfister M, Blin N, Zenner HP, Pusch CM, Smith RJ. Genetic heterogeneity of deafness phenotypes linked to DFNA4. *Am J Med Genet A*. 2005 Nov 15; 139(1):9-12.
- Yang T. The molecular basis of making spiral ganglion neurons and connecting them to hair cells of the organ of Corti. *Hear Res* 2011; 278(1-2):21-33.
- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nature Genet* 1999; 21: 363-369.
- Young TL et al. Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the Wolfram syndrome gene WFS1. *Hum Mol Genet*. 2001 Oct 15; 10(22):2509-14.
- Zhang Y, Knosp BM, Maconochie M, Friedman RA, Smith RJH. A comparative study of *EYA1* and *EYA4* protein function and its implication in branchio-oto-renal syndrome and DFNA10. *JARO* 2004; 5:295-304.
- Zheng J et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 Mar 8; 108(10):4218-23.
- Zhu M et al. Mutations in the gamma-actin gene (*ACTG1*) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am J Hum Genet*. 2003 Nov; 73(5):1082-91. Epub 2003 Sep 16.
- Zwaenepoel I, Mustapha M, Leibovici M, Verpy E, Goodyear R, Liu XZ, Nouaille S, Nance WE, Kanaan M, Avraham KB, Tekai F, Loiselet J, Lathrop M, Richardson G, Petit C. Otoancorin, an inner ear protein restricted to the interface between the apical surface of sensory epithelia and their overlying acellular gels, is defective in autosomal recessive deafness DFNB22. *Proc Nat Acad Sci* 2002; 99: 6240-6245.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

MATERIAL SUPLEMENTARIO1.- Dirección de páginas web consultadas:

| | |
|---------------------------|---|
| Agilent Suredesign | https://earray.chem.agilent.com/suredesign/ |
| BDGP | http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html |
| Database Genomic Variants | http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home |
| Decipher | https://decipher.sanger.ac.uk/ |
| Ensembl | http://www.ensembl.org/index.html |
| Exome Variant Server | http://evs.gs.washington.edu/EVS/ |
| Hearing Loss Homepage | http://hereditaryhearingloss.org/ |
| SeattleSeq | http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation141/ |
| Spanex | http://csvs.babelomics.org/ |
| UCSC | https://genome.ucsc.edu/ |
| wANNOVAR | http://wannovar.usc.edu/ |

2.- Secuencia de los cebadores utilizados para la realización de este trabajo:

Síndrome de BOR

| Gen | Exon | Oligonucleótido directo (secuencia 5'→3') | Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3') | Tamaño (pb) |
|--------------|------|---|---|-------------|
| EYA1 | -1 | GGGGCGCGTTTCATTACATA | GGCTTTGCCACAGGACAG | 737 |
| EYA1 | 1 | CCTGCAGGAGGAAACAACAGTTG | CGAGGCTCCTATTCCCTTTCTACAT | 423 |
| EYA1 | 1' | TGCAAGTGTGTTTCAAAGGTGTCA | TGGTGAAACGAAACCAATCTACG | 439 |
| EYA1 | 2 | GCTGCTTTTAAAGGGTAACTTGTA | CCCTTTTATACCCCATTTATTGGA | 551 |
| EYA1 | 3 | AATTTCCATCTCCGCAGGTCA | TGGAACATGTGGGCACAGACAT | 302 |
| EYA1 | 4 | AGCTGGAATTTGTGATGTGGTTGT | TAAATTGGCCAAAGATTGGGTCTT | 333 |
| EYA1 | 5 | TTTGTAGTTAAACGGTTGTGGAAGTG | CAGGGTTAAGGAAAATAGCAATGTG | 267 |
| EYA1 | 6 | ACCAATTCTGCCTTTTCTAAATGCT | TGAATTCACACGGGGGCATA | 474 |
| EYA1 | 7 | TGAATTCAGAAAAGGCTCAGAAACC | CTGCCAAAATTGTGCAACCAC | 401 |
| EYA1 | 8 | CCATGGTGATGGAAATAAAAGATGA | TATAAAAAAGAAAGCAGTAACAAAAGCA | 317 |
| EYA1 | 9 | CAGATTTTTCAATTCATCTTCCGTTT | TTGGCTCTTTTACATATTTTTTACCTTAC | 365 |
| EYA1 | 10 | TGCTTTCAGCCTCTCCCAATG | CTCTGAAAATCAACAGCCAAAGTAAAG | 380 |
| EYA1 | 11 | CAATTTTACAAGACTGCCACCTACTGA | TGCAGCAGGAAAGCCATCTGT | 359 |
| EYA1 | 12 | TCTTCAGATGATAACGGACAGGAC | ATGGCCAGTGAGATGAAACTGC | 434 |
| EYA1 | 13 | TTGCAAAGCCGAAGAAATATGTT | AATGCTGGGATGAGCTGAGTAGTT | 333 |
| EYA1 | 14 | AATTGAAGCCCTGACCGACT | ATAATTCTATCTTGCTGTTTGTTTAGC | 642 |
| EYA1 | 15 | TTGTGCTGTGGCACATACAACC | TCACGTTTCACATAAATGGAACCTG | 372 |
| EYA1 | 16 | GGAAATATCCATCCCCTTCTTCA | CGGCGCTGATGCGAGAC | 403 |
| SIX1 | 1A | CACCGCCAAGTTCCGACTCC | GCAGTTTGGGGTGGTTGTGA | 405 |
| SIX1 | 1B | CCTGCACAAGAACGAGAGCGTAC | CGGAGGAGAAAAGACGGCTTC | 493 |
| SIX1 | 2 | CAGCTCCCCTCCCTCCATCT | CAAGCTGCAAAAATGTTCTTGATT | 489 |
| EYA1_del_B14 | 7 | AAATGTGCAGCAGAAATAATGAGC | CTGGATTTAATAGTTCACAGCAGGTAA | 1744 |

Síndrome de Stickler***COL2A1***

| Exon | Oligonucleótido directo (secuencia 5'→3') | Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3') | Tamaño (pb) |
|----------------------------|---|---|-------------|
| 1 | CGC GGT TTG GGC GAG TT | GCC GGG GAG AAG GAT GCT | 381 |
| 2 | AGG TGG CCC CAG CCT ACA | CAT CTA TGG GAG CGT GTT TGC | 412 |
| 3-7 | AGC TGC CGC CTT CCT TGA T | TGG GAG CCA GCC AGG TAA GT | 1041 |
| 3_7 solo para secuenciar | AGGCTCCTGGCCTTGCTGT | | |
| 8 | CCC AAA ATT ACT TTC CAG GCA TC | GGC TAG CTG AAT GGG AGG TTA CA | 392 |
| 9-10 | AAA CAT GGC TGC TGT CCA GGA | GCA GCT GCG GTC CTA GTG GT | 519 |
| 11 | GCA CCT TTG CTC TGA CCT TCC | CTG GGT GCC TCC CTG TCA CT | 283 |
| 12 | GGT GCC CCC ACT ATG CTA CTG | ATA TAG GGG CTA CTG GCG TTT CA | 238 |
| 13-14 | GGA GGC TGG GCA GTT GTT ATT | AGC CAA GGC TGT TCT GAG GAG | 568 |
| 15 | AGA GCT CAG GGC ATT GTC CC | GGG AGC TCT TTG CAG CCA TC | 261 |
| 16 | GGG CCT GCA GGT AGA AAT GG | GTG CAG ACT CAG CCT GGG AAG | 298 |
| 17 | GGC ACA GTG TGT CCT TCG TTT T | TCA GAG TGC TGC TGT GGT TGC | 252 |
| 18 | AAG GCC TTT TAG CCA CAA TGG A | AAG GGA GCA GGT GGT TGT TGA G | 288 |
| 19 | TGG CAT GTG GAG GCT CAC TG | GGG CCA GAA TGA AGG TTT GG | 478 |
| 20-22 | CCA GGT CCC TGG ATC TGG ATC | ATG GCA GGG CAG AGG GAA GT | 811 |
| 23 | CTG CCA TGG CTC GTC CTT TAT | GCC TGC AGG ATT CTC AGA GGT T | 515 |
| 24-26 | TGA GCT CCT TCC CAG GAA GC | TCA GGC CTC CCT AAC CCA AA | 703 |
| 27 | CCC ATG GGT GTG ATG TGG TC | GCC ATG GAT TTT CCC CAA AT | 420 |
| 28 | AAA TCC ATG GCC CCA CAG AG | ATG GAA GCC TTC CCC AGC TC | 506 |
| 29 | GGG CCC TTT GGG TGT CTA CAC | AGT AGG GCC CAG GGG AGG TC | 606 |
| 30-31 | GGC ATG CAT GCA CTG TCT GAG | CTC ATG CCC TCT TGC CCT TG | 576 |
| 32-33 | GTG AGG CCT GGG AAT GTC CTG | CTC CTG AGC CCG CTC CTC TT | 526 |
| 34 | CCT GGT TAC CCA GGC TCC AT | GAT GAA GGA ACA GGG GAA AGG A | 375 |
| 35 | AAT TCC TCT TGG GCA GGG ACT | ACT GCC CAG CCC TCT CTC CT | 252 |
| 36 | AAT GGG GCC AGA GGG TAA GTG | TTG GCC GAG GGT GAC AGT G | 297 |
| 37 | GGG GGC CCT CTC AGA AGT GA | GTG ACG TGC CTT CCC CCT TC | 485 |
| 38 | GCT CTT GGA GGG GAG CAG AAG | GCG GGA AAG GAG AGG AGA GG | 245 |
| 39 | GGG TTT TAG CCT GCC CCT CA | CCC TAC ACC CCA CCC ACA CA | 326 |
| 40 | TCC TGT GGC AGA GGG GAC AG | CAG TGC ACC CAG CCC ACA G | 403 |
| 41 | AAC CGG AGG CAG GGA AAC AG | CAT GCC TGC CTG TGC CTC TC | 296 |
| 42-44 | GCC TGG ATG AGG AAG GGT GAG | GGG CCC TGA CTG GGA CTT GT | 900 |
| 42_44 solo para secuenciar | GGGCCACTGTCA GTTCTCATCTC | CCCAGCCTCTTCTGTCCTCTCA | |
| 45-47 | GAG GCC TGG GCT TCT GAG AG | CCA CCC AAG CTG AGG AAT CC | 762 |
| 48-49 | CAG CTT GGG TGG GAC AGG AG | TTC CCC AGA AGC AGC AGC AT | 573 |
| 50 | CCA GCC TTC CCT GTG GTG AC | AAG AGG CCC TGA GCA AAA AAG A | 242 |
| 51 | CAT GGA GGG GCA CTT TCA CAC | GCC CTG TAC TAG GGG GCA TCT C | 436 |
| 52 | CAG GCC TGG GTC TCT CAA GCT | GCC CAA CAG AAA ACT GGA GGA A | 379 |
| 53 | CCC CAG TAC CCT TGA GGT CCT T | TGA GCC AGG GGA ATG GAG AAG | 556 |
| 54 | AGC TGG AAC TGG GTA GCA AGG | TCA AGT TTT GGT TTC TGG TCC TG | 880 |
| F3:4 para cDNA | GAAAGGAGAACCTGGAGACATCAA | | |
| R3: 8 para cDNA | | TGGTCCTTGCACTTACTCCCAACT | |
| F5: 5-6 para cDNA | CCTGGGCCTCAGGGACCT | | |

| Microsatélite | Oligonucleótidos directo (secuencia 5'→3') | Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3') | Tamaño (pb) | Marcaje |
|---------------|--|---|-------------|---------|
| D12S345 | CAGCCTGGGTAACAAA | AGCAATGTGTGCATTTC | 209-238 | HEX |
| D12S85 | GCACCTCTCACTCCATTACA | AAATGAAAGTCAAGGGGAAC | 100-128 | FAM |
| D12S368 | GCAACACCTTTGTGATGAAAAT | AGTCTGCACAGCCTGTCC | 200-216 | FAM |

Síndrome de Stickler

COL9A1

| Exón | Oligonucleótido directo (secuencia 5'→3') | Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3') | Tamaño (pb) |
|--------------------------|---|---|-------------|
| 1 | CTT TGC TTT TAG CCC TCA C | TGC AAA AAT ACA GAC CCT TG | 249 |
| 2 | TTA CTA GGT TTG AAA ATA TGG AAG TGT T | CCA AAG CTG GAT TGA AGA GTG A | 284 |
| 3 4 | TTT AAG TTA GAG TGG ATG AAG TAG AAT GA | TAT CCA TTT TTA ATG CAT TTG AGT CA | 451 |
| 3_4 solo para secuenciar | TGATCTGATCTCTCAGTTCAGGTA | AAGCATGCATTTTCAATAGGGTACA | |
| 5 | AAT ACA TAT GGG TAC AGG AAA CAA GAT G | CAG CTG ATT ATC AAA GAT GCT TGA GA | 541 |
| 6 | AGC TTC CAA CCC ATT TCC ATT A | TCC ATA AGC TAC CAA AGG GAC AA | 530 |
| 7 | GCC CCG GTA AGT ATT TGT CC | GAT AGG ACT CGC GGC AGG TG | 493 |
| 8 | CGG CCT CCT CTG GAA GGT AA | CAG GAG CCC TGG GAA AAG AAT | 263 |
| 9 10 | ACC TCC ACG TTT GAC CCT TAC A | CTT TTG CAA AAG CTG CCA GTT | 529 |
| 11 | TGC AGT TAG CAG GAA GTT AGG AGT AT | TTT ATG GCT GCA TAG TAT TCC ACA T | 464 |
| 11' | CCA GCA GGC TTT CTC CAG TTT AC | AGG TTT TCG AGT GCT TTC TTT CAT T | 322 |
| 12 | CCT GCA CAT GTA CCC CTG AAC TTA | TAC CAG ATG TCA TCA ACT TAT TTC TCA | 376 |
| 12 solo para secuenciar | TGCTTTCAATATTTATGCAGTTTCA | | |
| 13 | AGC CGT GTT TGC TTT TCT TTA TTC | GCC ACC TAA GAT CTT GCA GGT AGA | 313 |
| 14 | GTC ATT GGA AAC CAA AGC TAA TAC A | TTG CTT TCC CAA ATA ACA TCT TCT A | 242 |
| 15 | ATC GAT TTT GGT GGC AGG TCT AT | TGG AAA TTT GGG ACA ATG ACT CA | 306 |
| 16 | TGC CCA TGA GTC AGG ATT TTA GA | ACA GAC TGC TCT GCC ATT TGA GT | 334 |
| 17 | GGA GTT CTG TAA CTG GAA TCC CTT A | AAC CTC CAT GTC TTG GTA GGA ATA C | 353 |
| 18 | TTA AGG CAT TAA TTT TCT TTG TGA CA | TGA TGC ATC TGC TTA GAA CTT ATC AA | 348 |
| 19 | AAG TAG AAT AAT TCA GGA GTC ACC AAG T | GTA ATG CTA TTC ATC CAA CTG CTA AA | 281 |
| 20 | CCA TTG TCT AGA TCA GCT TTT GTG A | CTG AGA CAG GAG AAT CGC TTG AA | 351 |
| 21 | TAA TTA CTC CTC AGG GAT CAC TGT GT | AAG GCG TCC TAA TAA CCA AAG AAA | 478 |
| 22 23 | TTG GTG ACG TGG ATG ATA CTT TCT A | AAT GAT CAC TGA AAA ATG TGC TTG AT | 375 |
| 24 | TGC AAT GAA ACT TTA GAA AAT AAT GAA | CAA AAT GCA CAG TCT CTC TCA ACT T | 387 |
| 25 | AAA ATT GCC CTG TTG ATG AAA GTA A | CAT CAT ATC TTC CCC AGA ACT TAT CA | 396 |
| 26 | CAT GCC CTC TAA ACT GTG GGT AAT | GTT TTA TAC TGG CAA AGG ATG ACA TT | 481 |
| 27 28 | CTG CAC ATT CCC AGA TTC TCA GT | GAC TAG CAT GGG CTC AAA CAT CA | 452 |
| 29 | TGT AGG ATG GCC TAT GCC TTT AG | TTG AAA TTT CCC CTT TAC ATT GTT CT | 330 |
| 30 | CAC GTT TAT TTT AGA CAC AAG TCA ACA | AAT TGA GGG CTA AGT AGA AAG TGT GAT | 434 |
| 31 | GAA CGT CCT CTC CCA TCA CAT T | AAC TCA ACA CCA GGT TTC ACT CAC T | 311 |
| 32 | CTA GAT TGG AAA GCC GCT GAG A | CTG CAA TCT TGG GAG ACT TTT GTT A | 396 |
| 33 | CTG GGA GGC TAC ATA GCT TAC AGA G | GAG GTT GCA GTG AGC CAA GAT T | 425 |
| 34 | CTT TAT GCT TAG CCC TGG TTT GAT | CAG GTG GCT GGA TTT ACA AGA GAA | 302 |
| 35 | GCA TCA GCT TCT CAA CAA GTT CTC T | TTG AGG CTA CGG GCT GTA TAC TAT T | 382 |
| 36 | CAA TTT TGA AGA TCT GGT GAC ACA T | TTT GAA TCT TCA CCG TCA CTA TTGA | 462 |
| 37 | AAT TTC ATG ACC TTT TGG TTT CTGA | AAG CTG GTC TTG AAA AAT CTA TGC TA | 340 |
| 38 | GCC ATG CCC TCT GCC AGT T | TTG TAA TCA TGC TGA AGG TAA TCA TCT | 367 |

| Microsatélite | Oligonucleótidos directo (secuencia 5'→3') | Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3') | Tamaño (pb) | Marcaje |
|---------------|--|---|-------------|---------|
| D6S1619 | GGCCTTGCTCTAACTTGCT | GTCTCCTCNTCAAAGTGCTG | 189-211 | FAM |
| D6S455 | CATACCTTTAGGGA CTCTATGCCA | CATTTATTTCTAGTG CAGGCTGTT | 151-165 | HEX |
| D6S1681 | TGAGGACTCAACAGGCAG | AGTTTACAGGCTAGTAGGAAACG | 234-284 | HEX |

Cebadores utilizados para confirmar la segregación de las familias diagnosticadas por OTO-NGS-Panel

| Familia | Gen | Exón | Oligonucleótidos directo (secuencia 5'→3') | Oligonucleótido reverso (secuencia 5'→3') | Tamaño (pb) |
|---------|----------|------|--|---|-------------|
| AD2 | TECTA | 18 | TCACTCCAGATGTAACGA | ATAGAAAAAGCAATGTGCAC | 247 |
| AD4 | EYA4 | 10 | AAATTTCAAAGTGTCTCTCACAG | ACATATATGGCAACCTGAGAGTACT | 257 |
| AD5 | TECTA | 4 | TGGGGA GTGCAAGTCATGAGA | GAGTGCA GCGACGGAAACA | 228 |
| AD6 | MYO6 | 31 | GCATGCTTTCTTGCCTCTTTAGTC | CATTCA TGGACCAAAAGATTGAGA | 346 |
| AD8 | COL11A2 | 10 | CAAGGTTGGAGTTGAGATGGA | CAGGAAATTACTGGGCATGG | 674 |
| AD9 | KCNQ4 | 5 | CGGGA GA TGGGGGACCTTTA | TGGGAGACCTCGGGAAGT | 297 |
| AD12 | MYH14 | 2 | GGCAAGAGGTCTGGTAAAGGAA | TGGCAACCATGTAAAGTGTAGGAA | 675 |
| AD13 | MYO6 | 12 | AGTACGGGTGTTTGACAAGGATAG | TGTTTTTCCTTGACAAACTGCAA | 377 |
| AD15 | TECTA | 18 | TCACTCCAGATGTAACGA | ATAGAAAAAGCAATGTGCAC | 247 |
| AD16 | TECTA | 10BC | CGTCTTCTCCTTGACCACCT | CTGTGGTGCA CAGGATGAGT | 471 |
| AD17 | TECTA | 17 | GATTTGCCTTTTCGTAATAACTGT | AGGACAATAAATGTGCAAAACACT | 307 |
| AD18 | GJB2 | 2 | ACCTGTTTTGGTGAAGTTGTGT | CCTACAGGGGTTTCAAATGGT | 985 |
| AD23 | POU4F3 | 2C | CTCAGCGACGTGGAGTCAGAC | GCCTCGAGTGAACGCTTCTC | 381 |
| AD24 | TECTA | 18 | TCACTCCAGATGTAACGA | ATAGAAAAAGCAATGTGCAC | 247 |
| AD25 | TECTA | 13 | TGACCA CAGTCTGAATTTAATGCA | CCCTAGCCAACCCCTTGTTT | 485 |
| AD30 | POU4F3 | 2C | CTCAGCGACGTGGAGTCAGAC | GCCTCGAGTGAACGCTTCTC | 381 |
| AD31 | MYO6 | 34 | GTGGTATGTGTGTGTGTGTG | GAATGTTTCATTGAGAGGTTATG | 527 |
| AD32 | POU4F3 | 2C | CTCAGCGACGTGGAGTCAGAC | GCCTCGAGTGAACGCTTCTC | 381 |
| AD33 | EYA4 | 12 | AAATCTCTTTTGGCATCAGG | CTTCAGAGTTGTAATAATGCCTATCA | 420 |
| AD34 | TECTA | 17 | GATTTGCCTTTTCGTAATAACTGT | AGGACAATAAATGTGCAAAACACT | 307 |
| AD35 | TECTA | 18 | TCACTCCAGATGTAACGA | ATAGAAAAAGCAATGTGCAC | 247 |
| AD36 | WFS1 | 8.5 | TCAAGCTCATCTCGTGTGG | CGATGAAGAACGGGAGCA | 285 |
| AD38 | MYO7A | 23 | AGGAGGTGGGACTGAGG | GGCAGAGAAGGAGGGAGG | 398 |
| AD42 | MYO6 | 10 | AATTCTTCATGGTTGGCATATT | CCAGAACCTGTCACTTCATAGAT | 360 |
| AD43 | KCNQ4 | 4 | GGGGTACGCTGGCTGTGAT | CCCTCTGACCTCGCCCTCT | 305 |
| AD46 | MYO6 | 25 | TTTTATAAATGAAAAATCTGCCAAA | CATGTACTTGCCATCATTGAGTCT | 360 |
| AD47 | MYO6 | 34 | GTGGTATGTGTGTGTGTGTG | GAATGTTTCATTGAGAGGTTATG | 527 |
| AD51 | MYO6 | 25 | TTTTATAAATGAAAAATCTGCCAAA | CATGTACTTGCCATCATTGAGTCT | 360 |
| AD55 | P2RX2 | 10 | CGGTTCCCATTTGCAAGTTT | AGCTGGGAGGAGGTGTGAG | 945 |
| AD56 | TECTA | 17 | GATTTGCCTTTTCGTAATAACTGT | AGGACAATAAATGTGCAAAACACT | 306 |
| AD60 | MYO7A | 31 | TGTCTGAACCTGACCGTTGGC | GCTAATGATGGCTCAGAGGGA | 409 |
| AD65 | CCDC50 | 11 | AGCGTTACTTAGAATGCCCTTTA | TTTCCACTACAACACGAGGCTTA | 220 |
| AD65 | WFS1 | 8.7 | CGACGTCAACCAAGGACATCG | GGCTCATGGCAACATGC | 332 |
| AD65 | P2RX2 | 1 | AGCCCCACCTGGGACACC | GCAACCAACGAAGTAGAGCA | 377 |
| AD67 | DFNA5 | 10 | GCTGGACGACAGAGCAAGACT | CATGCAAAAATGTCACCACTTCTAAA | 499 |
| AD69 | MYO6 | 3 | ATTGTTCTGTTTGGGGTTAATGA | CTCGAGTTCCTTCATTCAATGA | 391 |
| AD72 | POU4F3 | 2C | CTCAGCGACGTGGAGTCAGAC | GCCTCGAGTGAACGCTTCTC | 381 |
| AD73 | KCNQ4 | 5 | CGGGA GA TGGGGGACCTTTA | TGGGAGACCTCGGGAAGT | 297 |
| AD73 | WFS1 | 8.6 | CCGCGTGA CTGACATCGACAA | CTGGCGCAGGCTGAGCAG | 337 |
| AD92 | DIAPH1 | 7 | GGACACCATTTCAACCCATAAC | TTACCTAGTATTTATGACCGAGAGG | 343 |
| AD92 | TECTA | 5 | AAATAAGGTAGTTGGGCCAGTTA | GCCACAGACAGAGGAAAAGC | 266 |
| AD94 | KCNQ4 | 6 | TGTACCCCCAACAGCCGTAG | CTCCCCAGGCAAATGTGTGAC | 257 |
| AD96 | TECTA | 13 | TGACCA CAGTCTGAATTTAATGCA | CCCTAGCCAACCCCTTGTTT | 485 |
| AD102 | DFNA5 | 10 | GCTGGACGACAGAGCAAGACT | CATGCAAAAATGTCACCACTTCTAAA | 499 |
| AD104 | DFNA5 | 8 | GTAGAGAAGAGCTGCGGGTCGTA | GTGTCCCCAGAGCATAGATAGTAGG | 409 |
| AD105 | WFS1 | 8.5 | TCAAAGCTCATCTCGTGTGG | CGATGAAGAACGGGAGCA | 285 |
| AD107 | TJP2 | 1 | GGAAATGTGGGCACTATTGTAT | AGTCACTGGTGGGTTTTTAAAAAT | 360 |
| AD109 | TECTA | 13 | TGACCA CAGTCTGAATTTAATGCA | CCCTAGCCAACCCCTTGTTT | 485 |
| AD110 | CEACAM16 | 4 | ACCTAGCTTGGTGGAGAGAAAACC | ACAGCTCATGAATGAACGTGGAATCT | 495 |
| AD110 | MYH14 | 2 | GGCAAGAGGTCTGGTAAAGGAA | TGGCAACCATGTAAAGTGTAGGAA | 675 |
| AD111 | MYO6 | 6 | GCCACAGCCCATATATCAAGACA | CTACAGTGAGCTGTGGTGGTGACA | 502 |
| AD114 | CEACAM16 | 3 | CTCCGGCTGAGGGTGTGG | GGCTCAGTTTCCCATTC | 464 |
| AD115 | EYA4 | 4 | GAGATCACGTGGTCAATAGAATAAT | TTGGATATAATGCTGATTTGTGTTA | 341 |
| AD115 | MYO7A | 17 | GCCTTTGTCTGGGTGGTCA | GAGGTCAAGCAGATGTCAAGCC | 358 |
| AD116 | TECTA | 15 | ATGGCTGTTTTTGCTTCACTCA | CCCTAGAAAAAGCAATGCTACCA | 408 |
| AD121 | MYO7A | 30 | GCAAGAGGCCAAAGTCCAGAG | TCAGGGGGAAACCGAGG | 371 |
| AD123 | POU4F3 | 2C | CTCAGCGACGTGGAGTCAGAC | GCCTCGAGTGAACGCTTCTC | 381 |
| AD124 | DIAPH1 | 15 | AAAGCTGACAAAGGACTGGAAAGAT | TCCAGGACCAAGGAAAGAG | 528 |